

PH.D. ÉRTEKEZÉS

**A GLUTAMÁTERG NEURONÁLIS RENDSZER FEJLŐDÉSE A HUMÁN MAGZATI
BÉLIDEGRENDSZERBEN**

LINKE NIKOLETT

**TÉMAVEZETŐK:
DR. FEKETE ÉVA
EGYETEMI TANÁR
DR. BAGYÁNSZKI MÁRIA
EGYETEMI ADJUNKTUS**

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
ÉLETTANI, SZERVEZETTANI ÉS IDEGTUDOMÁNYI TANSZÉK**

**SZEGED
2008**

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések magyarázata.....	4
I. BEVEZETÉS.....	7
I.1. A bélidegrendszer általános felépítése.....	7
I.2. A bélidegrendszer szövettani felépítése.....	8
I.3. A bélidegrendszer embrionális fejlődése.....	11
I.4. Az entericus neuronok osztályozása.....	15
I.5. A bélidegrendszer neurokémiaja.....	16
I.5.1. Glutamáterg neuronok.....	17
I.5.2. Nitrerg neuronok.....	26
II. CÉLKITŰZÉSEK.....	30
II.1. A glutamát immunreaktív neuronok vizsgálata.....	31
II.2. Vezikuláris glutamát transzporter immunreaktív neuronok vizsgálata.....	31
II.3. Glutamát receptív neuronok vizsgálata.....	32
II.4. Az NMDA receptorokat tartalmazó neuronok kémiai kódja.....	33
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	34
III.1. A humán vizsgálati anyag előkészítése.....	34
III.2. A bélnyuzat preparátumok készítése.....	35
III.3. Paraffin metszetek készítése.....	36
III.4. Immunhisztokémiai festések.....	36

III.5. Mikroszkópos módszerek.....	40
III.6. Kvantitatív analízis.....	41
III.7. Szemikvantitatív analízis.....	41
III.8. Statisztikai analízis	42
IV. EREDMÉNYEK	43
IV.1. Glutamát immunreaktív neuronok a fejlődő béldegrendszerben	43
IV.2. Vezikuláris glutamát transzporter immunreaktív neuronok a fejlődő humán béldegrendszerben.....	46
IV.2.1. A vezikuláris glutamát transzporter 1 immunreaktivitás vizsgálata	49
IV.2.2. A vezikuláris glutamát transzporter 2 immunreaktivitás vizsgálata	55
IV.2.3. A vezikuláris glutamát transzporter 3 immunreaktivitás vizsgálata	57
IV.2.4. A vezikuláris glutamát transzporter immunreaktív myentericus neuronok morfokémiai jellemzése	61
IV.3. A glutamát-receptív myentericus neuronok vizsgálata	65
IV.3.1. NMDA receptor immunreaktív neuronok	65
IV.3.2. Glutamát receptív neuronok kémiai kódja	67
V. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	71
V.1. Glutamát-immunreaktív neuronok a fejlődő humán béldegrendszerben	71
V.2. Vezikuláris glutamát transzporter-immunreaktív neuronok a fejlődő humán béldegrendszerben.....	72
V.3. Glutamát receptív neuronok vizsgálata	76
V.4. Az NMDA receptorokat tartalmazó neuronok kémiai kódja	77

VI. ÖSSZEFOGLALÁS.....	79
VI.1 Magyar nyelvű összefoglalás	79
VI.2 Angol nyelvű összefoglalás	83
VII. IRODALMI HIVATKOZÁSOK	90
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	100
IX. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	101

RÖVIDÍTÉSEK MAGYARÁZATA

5-HT	szérotonin
ACh	acetil-kolin (acetylcholine)
AMCA	7-amino-4-metilkumarin-3-acetát (7-amino-4-methylcoumarin-3-acetate)
ANOVA	varianciaanalízis (analysis of variance)
ATP	adenozin-trifoszfát (adenosine triphosphate)
Bmp4	csontmorfogenetikus fehérje (Bone morphogenic protein)
BSA	borjú szérum albumin (bovine serum albumine)
cAMP	ciklikus-adenozin-monofoszfát (cyclic adenosine monophosphate)
cGMP	ciklikus-guanozin-monofoszfát (cyclic adenosine monophosphate)
CNS	központi idegrendszer (central nervous system)
Cy3	indocarbocianin (indocarbocyanin)
DAB	diamino-benzidín (diaminobenzidine)
eNOS	endothelialis nitrogén-monoxid-szintáz (endothelial nitric oxide synthase)
EC	enterokromaffin sejt (enterochromaffin cell)
ENS	bélidegrendszer (enteric nervous system)
FITC	fluoreszcein-izotiocianát (fluorescein isothiocyanate)
GABA	gamma-amino-vajsav (gamma-aminobutyric-acid)
ggl.	ganglion
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HuC/HuD	humán neuronális fehérje (human neuronal protein)
ICC	Cajal-féle interszticiális sejt (interstitial cell of Cajal)
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid-szintáz (inducible nitric oxide synthase)
IPAN	a bél fal elsődleges érző neuronja (intrinsic primary afferent neuron)

IR	immunreaktív
MAP2	mikrotubulussal asszociált protein (microtubule associated protein2)
mRNS	hírvivő ribonukleinsav (messenger ribonucleic acid)
mtsai.	munkatársai
NA	noradrenalin
NANC	nem adrenerg nem kolinerg sejtek (non-adrenergic non-cholinergic)
NF200	200 kDa-os neurofilament
NL493	NorthernLights 493
NL557	NorthernLights 557
NMDA	N-metil-D-aszpartát (N-methyl-D-aspartate)
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid-szintáz (neuronal nitric oxide synthase)
NO	nitrogén-monoxid (nitric oxide)
NOS	nitrogén-monoxid-szintáz (nitric oxide synthase)
NPY	neuropeptid Y (neuropeptide Y)
PACAP	hipofízis adenilátcikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenylate cyclase activating polypeptid)
PB	foszfát puffer (phosphate-buffer)
PM	plexus myentericus
PPA	Plexus Pattern Analysis
PS	plexus submucosus
Shh	sonic hedgehog gén
TRITC	tetrametil-rodamin-izotiocianát (tetramethyl rhodamine isothiocyanate)
VGLUT	vezikuláris glutamát transzporter
VGLUT1	vezikuláris glutamát transzporter 1
VGLUT2	vezikuláris glutamát transzporter 2

VGLUT3 vezikuláris glutamát transzporter 3

VIP vazóaktív intestinális polipeptid (vasoactive intestinal polipeptide)

Az idegen kifejezéseket az Orvosi helyesírási szótár (Akadémia Kiadó, Bp., 1992) szabályainak megfelelően használtam, az ún. vagylagos írású címszavak esetében általában a magyaros írásmódnak megfelelően.

I. BEVEZETÉS

I.1. A bélidegrendszer általános felépítése

A bélidegrendszer (enteric nervous system, ENS) a tápcsatorna falának különböző szövettani rétegei között helyezkedik el. A nyelőcsőtől egészen a belső anális záróizomig húzódik, de megtalálható a hasnyálmirigyben, az epehólyag falában és az epevezetékben is. A ENS a bélcső falában található entericus neuronok és gliasejtek, valamint a szimpatikus és paraszimpatikus idegrendszer posztganglionális neuronjainak axonjaiból áll (Brehmer 2006).

A ENS-t Langley (1921) különítette el az autonóm idegrendszer másik két divíziójától: a szimpatikus és a paraszimpatikus idegrendszertől. Ezt az elkülönítést a ENS számos tulajdonsága indokolja. A ENS a perifériás idegrendszer minden más struktúrájánál összetettebb. Neuronjainak száma meghaladhatja az adott faj gerincveljében található neuronok számát (Costa és mtsai. 2000). Az entericus neuronok önálló reflexívet alkotnak a bélfalban, ezért a ENS működése nagymértékben független a központi idegrendszertől (central nervous system, CNS).

Ugyanakkor a ENS szoros strukturális és funkcionális kapcsolatban áll az autonóm ganglionokkal és a CNS-rel. Egyrészt vannak olyan entericus neuronok, melyek axonjai kilépnek a bélből és a prévertebrális szimpatikus ganglionokhoz futnak. Másrészt a különböző szimpatikus és paraszimpatikus idegek posztganglionális rostjai belépnek a bélbe, s szabályozzák az entericus ganglionok működését (Costa és mtsai. 2000, Furness 2000).

A ENS-t felépítő neuronok között találunk érző, motoros és interneuronokat is, melyek a bélcső falának teljes hosszában reflexívet alakítanak ki (Furness 2000). Ezek a reflexívet szabályozzák a bélfal simaizomzatának működését, vagyis a bélperisztaltikát, a nyálkahártya váladéktermelését, a víz- és iontranszport-folyamatokat (Furness és Costa 1987), a

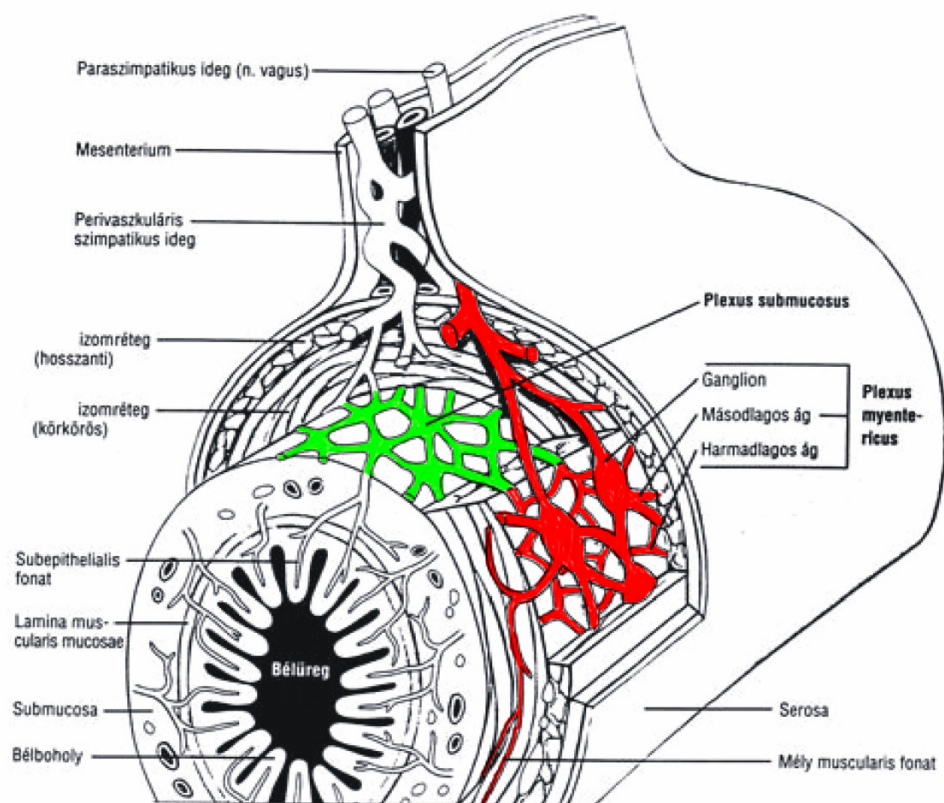
bélcsatorna vérátáramlását (Vanner és Surpernant 1996), az epehólyag és a hasnyálmirigy működését (Kirchgessner és Gershon 1990).

Az entericus neuronok, hasonlóan a CNS neuronjaihoz, változatos morfológiával és neurokémiai sajátosságokkal rendelkeznek. A CNS klasszikus ingerületátvivő anyagai a ENS-ben is megtalálhatóak (Furness és Costa 1987). Az enterogliasejtek különböznek a perifériás idegrendszerben megtalálható más gliasejtektől. Mind morfológiailag, mind funkcionálisan a CNS astrocytáival mutatnak hasonlóságot (Gabella 1972, 1987, Ibba-Maneschi és mtsai. 1995, Costa és mtsai. 2000, Brehmer 2006).

I.2. A bélidegrendszer szövettani felépítése

A ENS szövettani felépítésére jellemző, hogy benne a neuronok és a gliasejtek idegfonadékokat, vagy más néven plexusokat alkotnak. A bélfal minden egyes szöveti rétegének (nyálkahártya, izomrétegek, subserosa) van saját plexusa. A plexusoknak két alaptípusát lehet megkülönböztetni. A nagyobb ganglionált plexusokban a neuronok és a gliasejtek ganglionokba tömörülnek. A ganglionokat a neuronok nyúlványaiból álló internodális szegmentek kötik össze. A ganglionokat bazális membrán választja el a környező kötőszövettől és a véredényektől (Brehmer 2006). A ganglionált és a nem ganglionált plexusok morfológiája és felépítése jelentős különbségeket mutat a különböző állatfajokban. Egy fajon belül is alapvető szerkezeti és funkcionális eltérések lehetnek attól függően, hogy melyik bélszakaszt vagy melyik életkort vizsgáljuk.

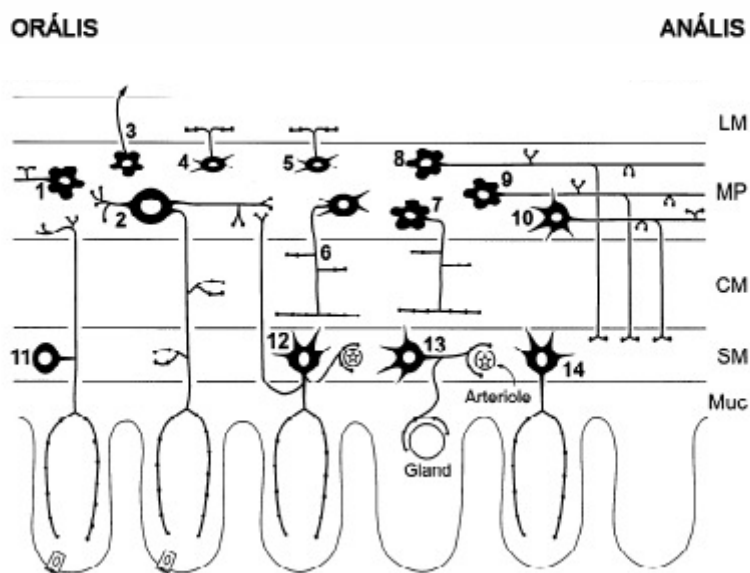
Az emlős ENS-t két nagyobb ganglionált plexus: a plexus myentericus (PM) és a plexus submucosus (PS), valamint több kisebb nem ganglionált plexus építi fel (1. ábra).



1. ábra Az emlős vékonybél szövettani felépítése. A nagyobb ganglionokból álló plexus myentericus (piros) a bélfal hosszanti és körkörös izomrétege között, a plexus submucosus (zöld) a körkörös izomréteg és a submucosa réteg között helyezkedik el. A többi szövettani rétegben kisebb nem ganglionált plexusok láthatóak (Gershon 1999 nyomán).

A PM vagy Auerbach-idegfonat (Auerbach 1864) a bél falának külső, hosszanti és belső, körkörös simaizomrétege között helyezkedik el a tápcsatorna teljes hosszában. A PM-t internodális szegmentekkel összekötött ganglionok építik fel. A neuronok és a gliasejtek elhelyezkedése valamint az axonok lefutása alapján elsődleges, másodlagos és harmadlagos plexusokat különítünk el. Az elsődleges plexust a ganglionok és a vastagabb idegkötegek, míg a másodlagos plexust az elsődleges plexusokból kilépő finomabb rostok építik fel. Ezek a körkörös izomréteg sejtjeivel párhuzamosan futnak, az elsődleges plexus és a körkörös simaizomréteg között. A harmadlagos plexust felépítő vékony rostok az elsődleges és a

másodlagos plexusból erednek, közel a hosszanti simaizomréteghez. A PM ganglionjai elsődleges érző neuronokat (intrinsic primary afferent neuron, IPAN), a körkörös és a hosszanti simaizomréteget innerváló serkentő és gátló motoneuronokat, interneuronokat, valamint az epehólyaghoz és a hasnyálmirigyhez projektáló neuronokat egyaránt tartalmaznak (2. ábra) (Kirchgessner és Gershon 1990). A PM elsődleges feladata a bélperisztaltika összehangolt működésének a biztosítása. A perisztaltikus reflex kialakításában résztvevő inter- és motoneuronok egy része orális irányba projektáló felszálló, serkentő; míg másik része aborális irányba projektáló leszálló, gátló neuron (2. ábra).



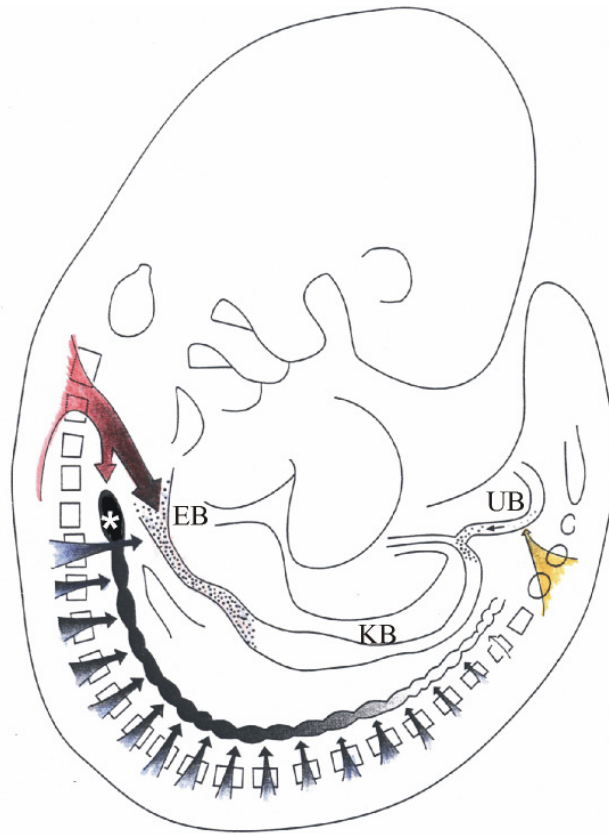
2. ábra. A vékonybélben található neurontípusok. 1. felszálló interneuron, 2. elsődleges myentericus érző neuron, 3. intestinofugális neuron, 4. hosszanti izmot innerváló serkentő motoneuron, 5. hosszanti izmot innerváló gátló motoneuron, 6. körkörös izmot innerváló serkentő motoneuron, 7. körkörös izmot innerváló gátló motoneuron, 8. leszálló interneuron, 9. leszálló interneuron, 10. leszálló motoneuron, 11. elsődleges submucosus érző neuron, 12. nem adrenerg nem kolinerg (non adrenergic non cholinergic, NANC) secretomotoros/ vasodilatátor neuron, 13. kolinerg secretomotoros/ vasodilatátor neuron, 14. kolinerg secretomotoros neuron. LM: hosszanti izom, MP: plexus myentericus, CM: körkörös izom, SM: plexus submucosus, Muc: mucosa (Furness 2000 nyomán).

A PS vagy Meissner-idegfonat (Meissner 1857) a bél falának submucosa rétege és a körkörös simaizomrétege között helyezkedik el. A PS-t kisebb ganglionok és a ganglionokat összekötő internodális szegmentek építik fel. A PS ganglionjai érző neuronokat, interneuronokat és a bélfal mucosa és submucosa rétegeit innerváló szekretomotoros neuronokat egyaránt tartalmaznak. A PS elsődleges feladata a bél szekretomotoros működésének szabályozása (2. ábra) (Costa és mtsai. 2000).

A fent leírtak alapján látható, hogy a perifériás idegrendszer többi részétől eltérően sem a PM, sem a PS nem tartalmaz tisztán érző vagy tisztán motoros ganglionokat.

I.3. A bélidegrendszer embrionális fejlődése

A perifériás idegrendszer többi részéhez hasonlóan a ENS-t alkotó neuronok és gliasejtek is a dúlcéscsejtekből származnak (Gershon és mtsai. 1993, Gershon 1999, Le Douarin 2004). A ENS-t felépítő neuronok a vagalis és a sacralis dúlcéscsejtek területéről vándorolnak a bélfalba (3. ábra) (Neu 1989, Taraviras és Pachnis 1999).



3. ábra A bélidegrendszert felépítő sejtvonalak emlős embrióban. A vagális dúclécsejtek két csoportja a sympathicoadrenális (kék) és a sympathicoenterális (piros) sejtek a bél proximális részén, míg a sacralis (sárga) dúclécsejtek a bél distális részén vándorolnak be a bélcsatorna falába. A sympathicoadrenális vonal sejtjei az előbelet (EB), míg a sympathicoenterális dúclécsejtek az egész belet kolonizálják. Az utóbél (UB) enterális idegrendszerét a sacralis dúclécsejtek alakítják ki. KB: középbél (Taraviras és Pachnis 1999 nyomán)

A vagális területről származó dúclécsejtek az előbél magasságában lépnek be a bélcsatorna mesenchimájába, majd anterior-posterior irányban vándorolnak tovább, és kolonizálják a tápcsatorna teljes hosszát (Le Douarin és Teillet 1973).

A vagális dúclécsejt eredetű prekursor sejtek két sejtvonalat képeznek. Az egyik a 2-5. szomita magasságából származó sympathicoenterális sejtvonal. Ezek a sejtek az egész belet kolonizálják, és a bélcsatorna teljes hosszában létrehozzák az entericus ganglionokat.

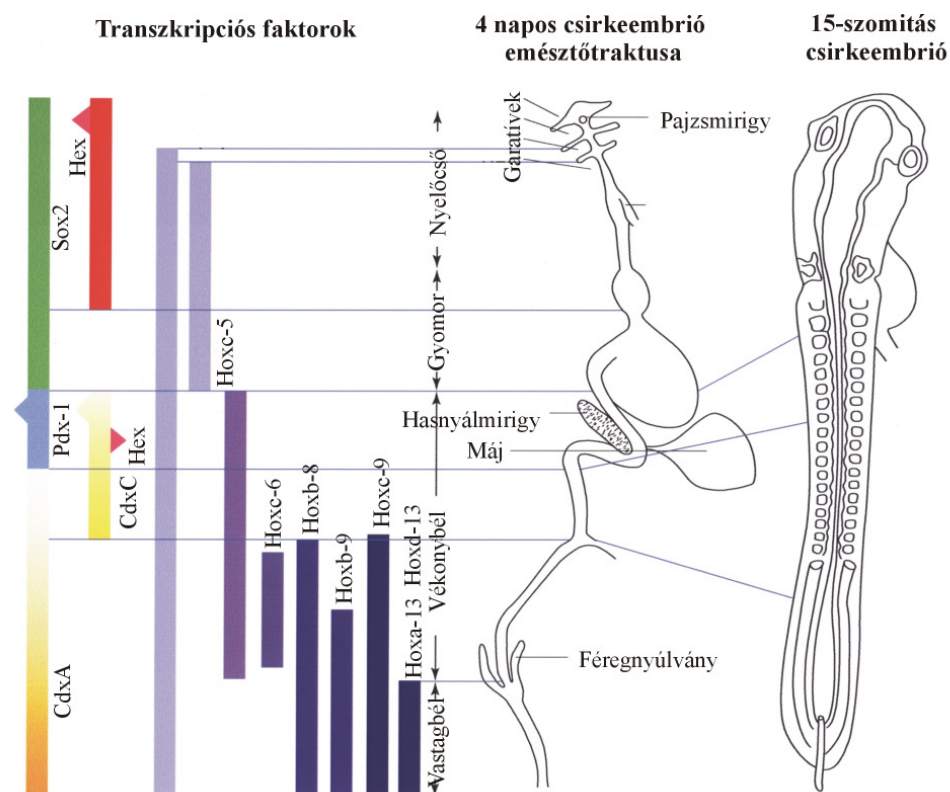
A másik a 6-7. szomita magasságából származó sympathicoadrenalis sejtvonal. Ezek a sejtek csak az előbél (nyelőcső, gyomor) területét kolonizálják (Durbec és mtsai. 1996, Taraviras és Pachnis 1999).

A sacralis dúclécsejt eredetű prekursor sejtek a bélcsatornának a postumbilicalis szakaszát népesítik be (Neu 1989, Taraviras és Pachnis 1999). Ezek a sejtek a 12. gesztációs hét környékén lépnek be az utóbél területére, amikor a vagalis eredetű prekursor sejtek már a bélcsatorna teljes hosszát kolonizálták (Gershon és mtsai. 1993, Newgreen és Young 2002a). A sacralis dúclécsejtek először feji irányba vándorolnak és kialakítják a ganglion pelvicust (Kapur 2000). Később a sejtek egy része elhagyja a ganglion pelvicust és belép a bélfalba, ahol neuro- valamint glioblastokká differenciálódnak (Doyle és mtsai. 2004).

A ENS fiziológiás fejlődéséhez nélkülözhetetlen az endoderma, a mesoderma és az ectoderma közötti szoros morfológiai és funkcionális kölcsönhatás (Roberts és mtsai. 1998, Wells és Melton 1999, Roberts 2000).

Közvetlenül a csíralemezek kialakulása után megjelennek a mesodermából és az endodermából származó jelmolekulák (Grand és mtsai. 1976, Montgomery és mtsai. 1999), melyek hatással vannak a dúcléc eredetű multipotens progenitorsejtek vándorlására és differenciációjára (Gershon 1998, Giaroni és mtsai. 1999, Taraviras és Pachnis 1999).

Számos gént is azonosítottak, melyek közvetve vagy közvetlenül szabályozzák a ENS morfogenezisét. Ezek közül a Hox gének szerepe a legjelentősebb (Beck 2002). A Hox gének a bél mesodermájában és endodermájában régió-specifikus expressziós mintázatot mutatnak, és szabályozzák a bélcsatorna anterior-posterior tengelyének kialakulását (4. ábra).



4. ábra A fejlődő csirkeembrió endodermájában kifejeződő gének. A transzkripciós faktorokat kódoló gének az endoderma specifikus régióiban fejeződnek ki. A gének nemcsak a már kialakult szervekben (4 napos csirkeembrió emésztőtraktusa), hanem már az organogenezis előtt álló endodermában is (15-somitás csirkeembrió) régió-specifikusan fejeződnek ki (Grapin-Botton és Melton 2000 nyomán).

A Hedgehog rendszer működése is alátámasztja a csíralemezek közötti szoros kölcsönhatást. A sonic hedgehog (Shh) gén az endodermában expresszálódik, míg a receptora a mesodermában van jelen. Az aktivált Shh receptorok indukálják a Hox gének expresszióját és a csont morfogenetikus fehérjét (Bone morphogenic protein 4, Bmp4). Ez utóbbi gátolja az entericus neuronok idő előtti differenciációját (Roberts 2000, Fukuda és Yasugi 2002).

Az endoderma és a mesoderma jelátviteli folyamatai közötti kölcsönhatás a magyarázata annak, hogy a ENS mikrokörnyezetét biztosító szöveti struktúrák morfogenezise és a ENS fejlődése között szoros összefüggés van (Fekete és mtsai. 2000).

A dúcléc eredetű multipotens progenitor sejtek végső fenotípusukat a bélben érik el. A különböző neurokémiai sajátosságokkal rendelkező sejtek a különböző bélszakaszokban eltérő dinamikával fejlődnek, ami jellegzetes bélszakasz-specifikus anatómiai, neurokémiai és funkcionális különbségeket eredményez (Young és mtsai. 1993, Bagyánszki és mtsai. 2002a, Schemann és mtsai. 2002, Phillips és mtsai. 2004).

A humán magzati bélcsatornában az első neuronális fenotípust mutató sejtek a gestáció nyolcadik hetében jelennek meg (Fekete és mtsai. 1996). Az első, átmenetileg katecholaminerg sejtek a bélfalban differenciálódnak, morfológiailag és neurokémiaileg is megváltoznak (Fekete és mtsai. 1996, Newgreen és Young 2002b). A differenciálódás során a neuronokban olyan szignalizációs molekulák jelennek meg, amelyek transzmitter és receptor funkciójuk mellett trofikus faktorként is működnek (Roche és mtsai. 2001, Hippenmeyer és mtsai. 2004). Így a korábban megjelenő neuronok szabályozzák a később megjelenő neuronok vándorlását és differenciálódását.

A ganglionált plexusok kialakulása során a ganglionokat felépítő entericus neuronok száma és területi eloszlása jelentősen megváltozik (Giaroni és mtsai. 1999, Krantis 2000, Roche és mtsai. 2001, Hippenmeyer és mtsai. 2004). A ganglionok eltávolodnak egymástól, a ganglionokat összekötő szegmentumok hossza megnő, ezzel egyidejűleg csökken a ganglionok denzitása és a ganglionon belül a neuronok denzitása is (Schafer és mtsai. 1999, Bagyánszki és mtsai. 2000, Román és mtsai. 2001).

I.4. Az entericus neuronok osztályozása

Az entericus neuronokat elsőként az orosz hisztológus, Dogiel osztályozta dendritjeik alakja, illetve hossza alapján. Dogiel eredetileg két idegsejttípust különített el (Dogiel 1896). A Dogiel I-es típusú neuronok viszonylag kis méretűek, egy hosszú (uniaxonalis) és sok rövid

nyúlvánnyal (multidendriticus) rendelkeznek. Ezeket a neuronokat funkciójukat tekintve motoneuronnak tartják. A Dogiel II-es típusba tartozó idegsejtek nagyobbak, több hosszú nyúlvánnyal rendelkeznek (multiaxonalis) és általában rövid nyúlványaik nincsenek (adendriticus). Ezek funkciójukat tekintve valószínűleg szenzoros vagy szekretomotoros idegsejtek. Az ismeretlen funkciójú Dogiel III-as típusú neuronok hasonlítanak a Dogiel I-es típusú neuronokra, de kevesebb dendritjük van, és axonjuk az I-es típustól eltérően hosszan követhető. Azóta elektrofiziológiai módszerekkel további sejttípusokat is sikerült azonosítani. Ezek a rostos, a IV-es típusú, az V-ös típusú, a VI-os típusú és az ún. kis neuronok (Brehmer és mtsai. 1999a). A rostos neuronokat leszálló interneuronoknak (Clerc és mtsai. 1998), a IV-es típusú neuronokat szekretomotoros idegsejteknek (Brehmer és mtsai. 1999b), míg a kis neuronokat motoneuronoknak (Clerc és mtsai. 1998) vagy nyálkahártya efferenseknek (Brehmer és mtsai. 1999b) tekintik.

I.5. A bélidegrendszer neurokémiaja

A ENS-ben, hasonlóan a CNS-hez, sokféle ingerületátvivő anyag van jelen, és a klasszikus ingerületátvivő anyagok mellett számos peptidtermészetű anyag tölt be szabályozó szerepet (Lomax és Furness 2000, Hens és mtsai. 2001).

Eddig az acetil-kolinról (ACh), a noradrenalinról (NA), a nitrogén-monoxidról (NO), a vazoaktív intestinális polipeptidről (vasoactive intestinal polipeptide, VIP), a szerotoninről (5-HT) és a glutamátról bizonyították, hogy az ENS-ben mint neurotranszmitterek vannak jelen (Kirchgessner 2001). Ezek mellett gyakran fordul elő az adenzin-trifoszfát (ATP), a tachykinin, az enkefalin, a hipofízis-adenilát-ciklázt aktiváló polipeptid (pituitary adenylate activating polypeptide, PACAP), a neuropeptid Y (NPY), a gamma-amino-vajsav (gamma

aminobutyric acid, GABA), a szomatosztatin, a kolecisztokinin és a galanin (Furness és Costa 1987, Furness 2000).

Mivel munkám célja a glutamáterg rendszer fejlődésének vizsgálata volt a fejlődő humán magzat ENS-ében, a továbbiakban a glutamáterg neuronokkal kapcsolatos irodalmat tekintem át részletesen. Irodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy a PM glutamáterg és nitrerg neuronjai között funkcionális kapcsolat van (Lowenstein és Synder 1992, Ayata és mtsai. 1997). Ezért a glutamáterg neuronok lehetséges célsejtjeinek vizsgálatát a nitrerg neuroncsoporttal kezdtük, így a nitrerg rendszer irodalmáról is részletesebb áttekintést adok.

I.5.1. Glutamáterg neuronok

A CNS-ben a legtöbb gyors szinaptikus neurotranszmisszióért a glutamát felelős. A glutamátnek a CNS-ben nélkülözhetetlen szerepe van a neuronális plaszticitásban, a tanulási folyamatokban, a memóriában és a viselkedési formák kialakításában (Foster és Fagg 1984, Mayer és Westbrook 1987, Skerry és Genever 2001, Hayashi és mtsai. 2003). Mindezek mellett a glutamát meghatározó jelentőségű a CNS fejlődésének szabályozásában is (Gudz és mtsai. 2006, Manent és mtsai. 2006). A CNS embrionális fejlődése során a glutamát stimulálja a neurogenezist, a sejtváándorlást és a szinaptogenezist is (Mc Donald és Johnston 1990, Van Kesteren és Spencer 2003). A neocortex fejlődésében meghatározó szerepet játszó Cajal-Retzius sejtek szintén glutamátot használnak (Del Río és mtsai. 1995, Hevner és mtsai. 2003).

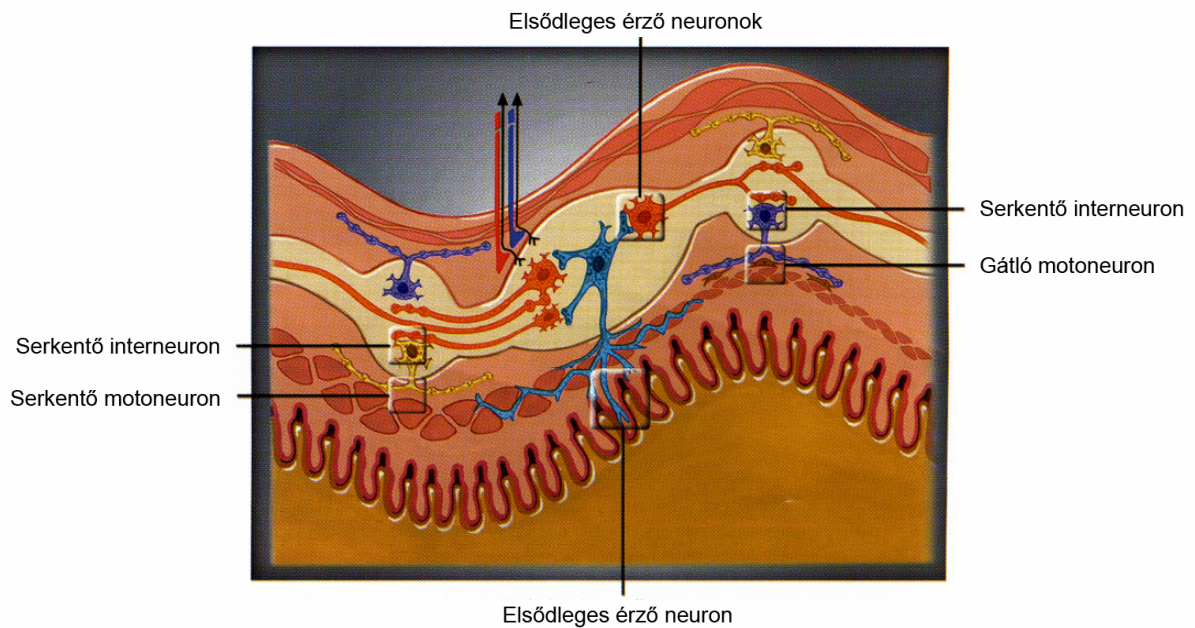
Az utóbbi évek kutatási eredményei alapján elmondható, hogy a glutamát nemcsak a CNS-ben, de a környéki idegrendszerben, azon belül a ENS-ben is jelen van mint serkentő neurotranszmitter (Sinsky és Donnerer 1998, Kirchgessner 2001). A ENS-ben is megtalálták a glutamáterg neurotranszmisszió minden komponensét. Vannak glutamátot expresszáló neuronok (Liu és mtsai. 1997), glutamáterg idegvégződések (Liu és mtsai. 1997, Kirchgessner

2001), különböző glutamát receptor mRNS-ek (Broussard és mtsai. 1994, Burns és mtsai. 1994, Burns és Stephens 1995, Tong és Kirchgessner 2003), glutamát receptor fehérjék (Galligan 2002) és különböző glutamát transzporterek (Liu és mtsai. 1997, Tong és mtsai. 2001). Bizonyították azt is, hogy a glutamát szerepet játszik a helyi reflexek irányításában (Kirchgessner 2001), az entericus neuronok működésének szabályozásában és a vago-vagalis reflexek közvetítésében is (Hornby 2001, Zhang és Fogel 2003).

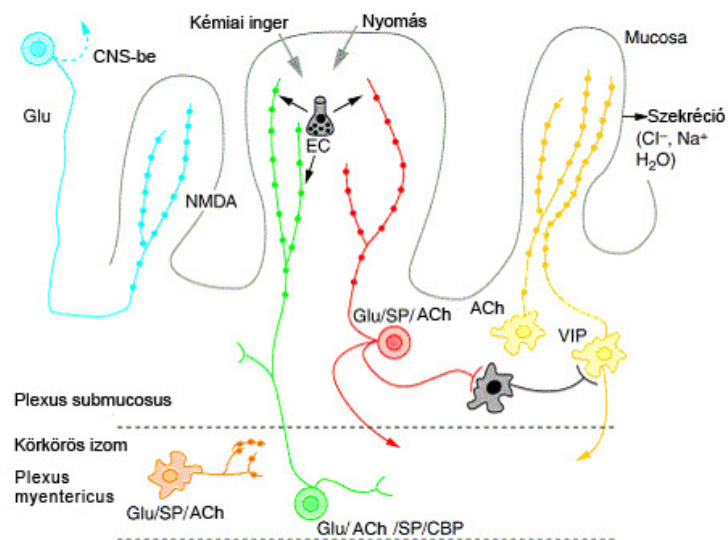
A glutamáterg neuronpopulációt a ENS-ben viszonylag kevés idegsejt építi fel, melyek a PM-ban és a PS-ban is megtalálhatóak (Liu és mtsai. 1997).

A glutamát általában más neurotranszmitterekkel kölcsönhatásban fejti ki hatását. Tengerimalacban a glutamáterg neuronok gyakran tartalmaznak kolin-acetiltranszferázt és P-anyagot (Liu és mtsai. 1997). Ezek alapján feltételezhető, hogy a glutamát és az ACh serkentő kotranszmitterekként vannak jelen (Kirchgessner 2001). Mindezek mellett a glutamát nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) enzimre gyakorolt serkentő hatását is leírták (Lowenstein és Snyder 1992).

A glutamáterg neuronok egy részét helyi IPAN-nak gondolják (Kirchgessner 2001, Furness és mtsai. 2004). Mint ilyenek kapcsolódnak mind a felszálló serkentő, mind a leszálló gátló interneuronokhoz is, így meghatározó szerepük van a perisztaltikus reflex kialakításában (5. ábra).



5. ábra A perisztaltikus reflexívben résztvevő neuronok elhelyezkedése a bél falban (Hansen nyomán 2003).



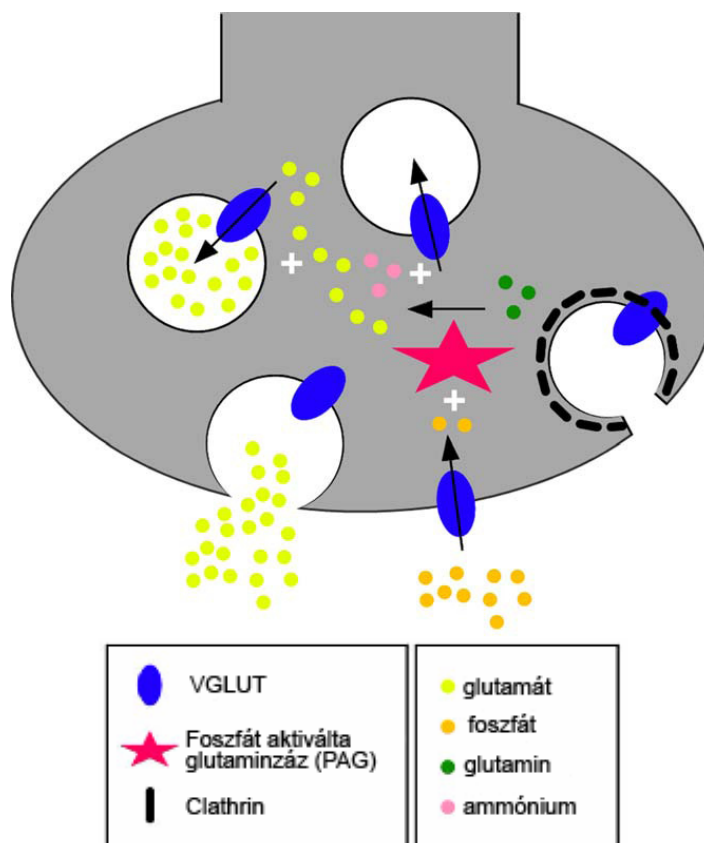
6. ábra A glutamát tartalmú neuronok elhelyezkedése tengerimalac vékonybélben. A glutamát immunreaktív neuronok elhelyezkedése a plexus submucosusban pirossal, míg a plexus myentericusban sárgával, illetve zölddel látható. Az extrinsic elsődleges érző neuronok (kék) (ggl. nodosum, hátsó gyöki ganglion) szenzoros információkat szállítanak a bélből a központi idegrendszerbe. A plexus submucosus glutamáterg szekretomotoros neuronjai (sárga) közvetve vagy közvetlenül más szekretomotoros neuronokkal lépnek kapcsolatba, s így biztosítják a szekretomotoros reflexkört (Kirchgeßner 2001 nyomán).

Az enterokromaffin (enterocromaffin, EC) sejtek a béltartalom kémiai összetételének vagy az abban uralkodó nyomásnak megfelelően 5-HT-t vagy más hormonokat szabadítanak fel (6. ábra) (Kirkup és mtsai. 2001, Gershon 2003). Az EC sejtek által felszabadított molekulákat a nyálkahártya alatt elhelyezkedő IPAN kollaterálisok receptoraikkal érzékelik (6. ábra). Az IPAN-ok vagy a nyálkahártyához bocsájtott nyúlványaikon keresztül (Liu és mtsai. 1997) vagy szekretomotoros neuronokkal szinaptizálva víz- és ionszekréciós reflexet (Furness 2000, Kirchgessner 2001), motoneuronokra hatva pedig perisztaltikus reflexet váltanak ki (6. ábra) (Grider és mtsai. 1996). A bélnyálkahártya víz- és ionszekrécióját a szekretomotoros neuronok által felszabadított ACh és VIP válthatja ki (6. ábra) (Furness 2000). E funkciókkal összhangban a glutamáterg neuronok nagy része a szekretomotoros vagy szenzoros neuronokra jellemző Dogiel II-es morfológiát mutat (Liu és mtsai. 1997).

A szekréció közvetlen szabályozása mellett a glutamát más, nem szekretoros ACh és VIP tartalmú entericus neuronok működését is szabályozza (Burns és Stephens 1995, Cosentino és mtsai. 1995, Giaroni és mtsai. 2003). Mivel mindkét neurotranszmitter megtalálható a motoneuronok különböző csoportjaiban (Furness 2000), valószínű, hogy a glutamáterg neuronok a szekréción kívül a perisztaltika szabályozásában is részt vesznek (Cosentino és mtsai. 1995, Sinsky és Donnerer 1998). Ezt erősíti az a megfigyelés, hogy az EC sejtekből kiinduló jel az IPAN-okon keresztül perisztaltikus reflex kiváltásához vezet úgy, hogy serkenti a kolinerg motoneuronokból az ACh felszabadulását, és ennek hatására a simaizom kontrahál (Gershon 2003). A glutamát a bélből készített szervpreparátumokon is simaizomkontrakciót vált ki (Jankovic és mtsai. 1999, Milovanovic és Jankovic 2002).

A glutamát minden állati sejtben előfordul, így a glutamát immunreaktivitás nem tekinthető a glutamáterg neuronok specifikus markerének (Otis 2001). A glutamát a neuronok citoplazmájában szintetizálódik, majd onnan szinaptikus vezikulumokba transzportálódik. A glutamát vezikulumokba történő transzportját a vezikuláris glutamát transzporter (VGLUT)

végzi (7. ábra) (Blaesse és mtsai. 2005). Ennek alapján a VGLUT jelenléte a neuronokban egyértelmű bizonyíték arra, hogy az adott neuron glutamát neurotranszmissziót végez.



7. ábra A vezikuláris glutamát transzporterek (VGLUT) a sejtben elfoglalt helyük alapján kétféleképpen működnek. Ha a VGLUT a szinaptikus vezikula membránjában található, akkor egy protonfüggő elektrokémiai grádiens mentén glutamátot szállít a vezikulába. Ha a VGLUT a neuron plazmamebránjában van, akkor anorganikus foszfátot és Na^+ - iont szállít a sejtbe. A megemelkedett foszfátkoncentráció stimulálja a foszfát- aktiválta glutamináz enzim (PAG) működését, ennek hatására fokozódik a glutamát szintézis. A PAG működése során a glutamát mellett ammóniumion is képződik. Az ammóniumion tovább fokozza a glutamát szinaptikus vezikulumokba történő transzportját (Takamori 2006 nyomán).

Emlősökben három különböző VGLUT gént azonosítottak, amelyek három VGLUT izoformát határoznak meg (VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3). Mind a három transzporter izoforma membránpotenciál grádienszt használ a glutamát felvételére (7. ábra) (Takamori

2006). Felnőtt patkány agyban végzett in situ hibridizációs és immunhisztokémiai vizsgálatok szerint a VGLUT1 és a VGLUT2 expressziója kiterjedt, míg a VGLUT3 expresszió egy nagyon szűk neuroncsoportra korlátozódik. Így a glutamáterg neuronok valós markerének a VGLUT1-t és a VGLUT2-t tekinthetjük. A három VGLUT izoforma szubsztrátspecifitása, kinetikája és farmakológiája nagyon hasonló. Ezzel szemben az expressziós mintázatuk jelentősen eltér.

A VGLUT1 és a VGLUT2 expressziója kizárólag a glutamáterg neuronokra, és a glutamáterg neuronokon belül is elsősorban azok axonvégződéseire korlátozódik (Gras és mtsai. 2005). Ezzel ellentétben a VGLUT3 nemcsak a glutamáterg neuronokban, hanem számos más sejtben is expresszálódik. A VGLUT3 expressziója a neuronokban szoros kapcsolatban áll más neurotranszmitterek, mint például az ACh, a 5-HT és a GABA felszabadulásával (Fremeau és mtsai. 2002, Gras és mtsai. 2002, Takamori és mtsai. 2002, Seal és Edwards 2006a). A VGLUT3 expresszió nemcsak a neuronok axonvégződéseiben, hanem a neuronok szomatodendritikus régióiban is megfigyelhető, ami felveti annak a lehetőségét, hogy a glutamát ezeken a membránfelszíneken is felszabadulhat (Seal és Edwards 2006b).

Felnőtt CNS-ben a három VGLUT izoforma eltérő expressziós mintázatot mutat. A két meghatározó izoforma közül a VGLUT1 a cerebrális és cerebelláris kéregben, valamint a hippocampusban dominál, míg a VGLUT2 expressziója a diencephalonban, az agytörzsben és a gerincvelőben a legkifejezettebb (Fremeau és mtsai. 2001, Herzog és mtsai. 2001, Fremeau és mtsai. 2004a, Nakamura és mtsai. 2007). Az eltérő expressziós mintázat azonban nem jelenti egyik, vagy másik izoforma kizárólagos előfordulását az adott agyterületen, hiszen nagyon sok neuronban a VGLUT1 és a VGLUT2 együtt fordul elő (Hisano és mtsai. 2002, Hioki és mtsai. 2003). A VGLUT3 expressziója a CNS-ben korlátozott, és érdekes módon nem korlátozódik a glutamáterg neuronokra, hanem gyakran fordul elő kolinerg,

serotoninerget, sőt GABA-erg neuronokban is (Fremeau és mtsai. 2002, Gras és mtsai. 2002, Schafer és mtsai. 2002). A három VGLUT izoforma expresszálódik a perifériás idegrendszerben és nem idegi perifériás struktúrákban is. A különböző VGLUT izoformák jelen vannak a nyelőcső harántcsíktal izmainak motoros végleteiben (Kraus és mtsai. 2004, 2007) és ugyancsak a nyelőcső területén az interganglionális lemezes végződéseken (Raab és Neuhuber 2003, 2004). A VGLUT1 és a VGLUT2 emellett expresszálódik a hím gonádokban (Tong és mtsai. 2001, Ewald és mtsai. 2006), a pancreas α sejteiben és az F sejtek pancreaticus polipeptideket tartalmazó szekréciós vezikulumaiban is (Hayashi és mtsai. 2001, 2003). A VGLUT3 expresszióját a májban és a vesében is leírták (Fremeau 2002).

Fejlődéstani vizsgálatokban érdekes változást figyeltek meg a hippocampus, a cerebrális és cerebelláris kéreg területén. Ezeken az agyterületeken embrionális korban a VGLUT2 izoforma a domináns, míg a 3. posztembrionális héttől a VGLUT1 izoforma veszi át a VGLUT2 izoforma szerepét, s a VGLUT1 izoforma dominanciája az életkor előrehaladtával egyre kifejezettebb lesz (Miyazaki és mtsai. 2003). Egy közelmúltban megjelent közlemény (Ina és mtsai. 2007) szerint a domináns VGLUT izoformák nagyon korán, a neurogenesis kezdetén megjelennek a fejlődő egéragyban. A VGLUT1 és VGLUT2 a kortikogenesis során térben és időben eltérő expressziós mintázatot mutat. In situ hibridizációs vizsgálatokkal kimutatták, hogy a VGLUT1 mRNS a 10. embrionális napon az előlemez és a marginális zóna mikrotubulussal asszociált protein 2 (MAP2) immunpozitív sejteiben, míg a VGLUT2 ugyanezen területek reelin pozitív sejteiben expresszálódik (Ina és mtsai. 2007). A VGLUT3 expressziós mintázata dinamikusan változik a pre- és posztnatális fejlődés során, ami arra utal, hogy a két domináns izoformával együtt ennek is fontos szerepe van a CNS fejlődésének a szabályozásában (Boulland és mtsai. 2004, Gillespie és mtsai. 2005, Seal és Edwards 2006b).

A VGLUT expresszió változását különböző farmakológiai manipulációkkal (De Gois és mtsai. 2005, Wilson és mtsai. 2005) és bizonyos idegrendszeri patológiás változásokkal (skizofrénia, Parkinson kór) is összefüggésbe hozták (Estwood és Harrison 2005, Kashani és mtsai. 2007).

A fent felsorolt anatómiai, fejlődéstani, farmakológiai és patológiai vizsgálatok eredményei vetették fel azt a kérdést, hogy a VGLUT expresszió tér- és időbeni változása hogyan befolyásolja a glutamát jelátviteli folyamatait. Az bizonyos, hogy a különböző VGLUT izoformák különböző szerepet töltenek be mind a felnőtt idegrendszerben, mind az idegrendszer fejlődési folyamatainak szabályozásában. Az is valószínű, hogy funkcionális szempontból az egyes VGLUT izoformák mennyisége is meghatározó. Sikerült bizonyítani azt, hogy a VGLUT expresszió szintje és a vezikulumokban tárolt és a vezikulumokból felszabadított neurotranszmitter mennyisége összefügg egymással. Bár már egy transzporter is elegendő lehet egy vezikulum telítésére, a transzportermolekulák számának a növekedése a transzmitter vezikulumok térfogatának a növekedését eredményezi. Így a VGLUT izoformák fokozott expressziója nagyobb mennyiségű neurotranszmitter felvételét és felszabadítását teszi lehetővé (Daniels és mtsai. 2004, Wojcik és mtsai. 2004, Wilson és mtsai. 2005, Daniels és mtsai. 2006, Edwards 2007). A célzott deléciónal előállított VGLUT1 hiányos egerekben a glutamáterg neurotranszmisszió drasztikusan lecsökkent, majd ha ugyanezekben az egerekben VGLUT1-et expresszáltattak, a glutamáterg neurotranszmisszió a normális szintre állt vissza (Wojcik és mtsai. 2004). Ez egyértelműen bizonyítja, hogy a VGLUT izoformák expressziós szintje meghatározó jelentőségű a glutamáterg neurotranszmisszió hatékonysága szempontjából.

A csökkent VGLUT expresszió hatása kevésbé tisztázott, de az bizonyos, hogy a csökkent VGLUT expresszió hatással van a viselkedésre. Azok az egerek, melyekben a VGLUT1 alacsonyabb szinten expresszálódik, ingerlékenyebbek, s memóriazavaraik vannak

(Tordera és mtsai. 2007). VGLUT2 heterozigóta egerek kevésbé reagáltak a neuropátiás fájdalomra (Moechars és mtsai. 2006, Wallén-Mackenzie és mtsai. 2006). A VGLUT izoformák expresszióváltozása különböző homeosztatikus változásokat is eredményez. Pl. zebrahalban fokozódik a retinotektális projekciók arborizációja (Smear és mtsai. 2007), vagy *Drosophila* neuromuszkuláris junctionok területén megnő a preszinaptikus membránnal fúzionáló vezikulák száma (Daniels és mtsai. 2006). Ugyancsak *Drosophilában* megfigyelték az axonterminálisok számának a növekedését, ami feltehetően a glutamáttal töltött vezikulák számának csökkenését kompenzálta (Verstreken és mtsai. 2003).

A VGLUT expresszióinak nemcsak a glutamát vezikulumokba történő transzportjában van nélkülözhetetlen szerepe, de elengedhetetlen a vezikulumok biogenezéséhez és reciklizációjához is. VGLUT1 vagy a VGLUT2 hiányos egerekben csökkent a sejtestben lévő vezikulumok száma. Ezek a vezikulumok elsődleges glutamát raktárként működnek, és biztosítják a glutamát neurotranszmisszióhoz szükséges glutamát mennyiséget (Freneau és mtsai. 2004b, Wallén-Mackenzie és mtsai. 2006).

A vezikulumokból felszabaduló glutamát különböző glutamát receptorokon keresztül fejti ki hatását. Az ENS-ben mind az ionotróp, mind a metabotróp glutamát receptorok jelen vannak (Liu és mtsai. 1997, Kirchgeßner 2001). A metabotróp glutamát receptorok pre- és poszt-szinaptikusan is megtalálhatóak. A metabotróp glutamát receptorok aktiválásán keresztül a glutamát nemcsak serkentő, hanem gátló hatású is lehet.

Az ionotróp glutamát receptorokat farmakológia sajátosságai és szelektív agonistáik alapján N-metil-D-aszpartát (NMDA) és nem NMDA típusú receptorokra osztják (Bertrand 1993, Jankovic és mtsai. 1999).

A glutamát gyors választ kiváltó hatását a nem NMDA-, míg a lassú választ kiváltó hatását az NMDA típusú receptorok közvetítik. (Liu és mtsai. 1997). Az NMDA típusú receptorok öt alegységből felépülő heteropentamerek. Az alegységeket egy NR1 gén és négy

NR2 (NR2A-D) gén kódolja. Az NR1 alegység nélkülözhetetlen a receptor működéséhez, önmagában is képes működő ioncsatornát képezni, s így funkcionális receptort létrehozni (Aicher és mtsai. 2000). Az NR2 alegység az ioncsatorna működésének hatékonyságát növeli (Hornby 2001, Lynch és Gutmann 2002).

Patkány és tengerimalac vékonybélben szinte minden entericus neuronon találtak NMDA receptort (Liu és mtsai. 1997). Tengerimalac ileumban és colonban a myentericus kolinerg neuronokon található NMDA receptor aktiválását ACh felszabadulás követi (Constentino és mtsai. 1995).

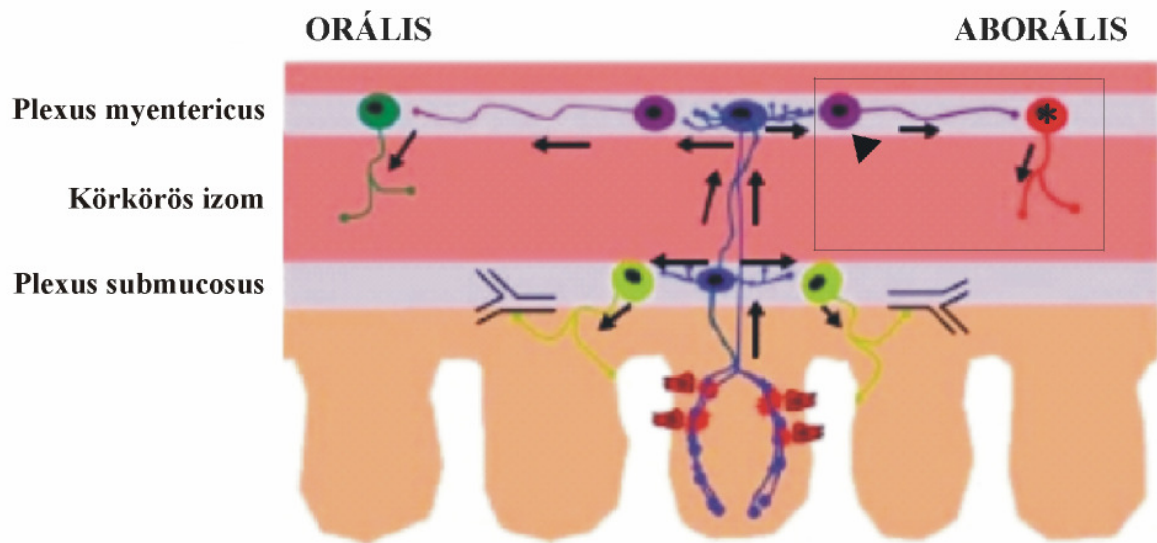
A glutamát receptor aktiválásának az egyedfejlődés korai szakaszában fontos szerepe van a sejtek túlélésének szabályozásában (Mount és mtsai. 1993). A glutamát receptorok sérülése apoptózishoz, súlyosabb esetekben embrió letalitáshoz vezet (Forrest és mtsai. 1994, Sprengel és mtsai. 1998, Monti és Contestabile 2000, Verhage és mtsai. 2000). A legkorábban született kortikális neuronokon NMDA receptort találtak (Behar és mtsai. 1999, Manent és mtsai. 2005). A különböző NMDA receptor alegységek expressziója patkánygyanban az első három postnatalis héten a legnagyobb, ami a glutamát jelátvitelnek a korai fejlődésben betöltött nélkülözhetetlen szerepére utal (Monyer és mtsai. 1994).

I.5.2. Nitrerg neuronok

A ENS motoros szabályozására jellemző, hogy a kontrakciót kiváltó serkentő neuronok, hasonlóan más izommotoneuronokhoz, kolinergek. A ENS gátló motoneuronjai azonban eltérnek más gátló izommotoneuronoktól. Itt a gátló ingerületátvitel az ún. nem adrenerg, nem kolinerg (NANC) transzmitterekkel valósul meg (Bogers és mtsai. 1991, Bredt és Snyder 1994, Mashimo és mtsai. 1996). Ilyen NANC gátló neuronok a bélben a neurotransmitterként NO-ot, VIP-et, ATP-ot, CO-ot és PACAP-et felszabadító motoneuronok (Furness 2000).

A nitrerg sejtekben a NO-ot a NOS enzim L-argininből alakítja ki, miközben a NO mellett citrullin is termelődik. A NOS-nak három izoformája ismert, a neuronális NOS (nNOS/NOS1), az endothelialis NOS (eNOS/NOS3) és az indukálható NOS (iNOS/NOS2). A NO, ellentétben a klasszikus neurotranszmitterekkel, nem raktározódik vezikulákban, és nem kvantumokban szabadul fel az idegingerület hatására. A NO diffuzibilis gáz, akadálytalanul kijut a sejtekből és bediffundál a környező sejtekbe. A NO-nak nincsen szokványos értelemben vett receptora. A NO a célsejtben közvetlenül aktiválja a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) képződését katalizáló enzimet, a guanilát ciklázt, így tulajdonképpeni receptora az enzim aktív centrumának a vasatomja (Bredt és Snyder 1994, Bredt 1995).

A NO általában nem önmagában, hanem különböző neuromodulátorokkal együtt fordul elő a neuronokban. A leszálló interneuronokban leggyakrabban a VIP és a NO együtt található (Keef és mtsai. 1994, Furness 2000, Brehmer és mtsai. 2004). A NO és a VIP kölcsönösen serkentik egymás felszabadulását (Allescher és mtsai. 1996). Mind a NO, mind a VIP a perisztaltika leszálló, gátló fázisában játszik szerepet (8. ábra) (Keränen és mtsai. 1995), azonban gátló hatásuk különböző mechanizmusokon keresztül valósul meg. A NO hatását a simaizomsejtek cGMP-szintjének növelésével éri el, míg a VIP a ciklikus-adenozin-monofoszfátot (cAMP) termelő adenilát-ciklázt aktiválja.



8. ábra A myentericus nitrerg neuronok szabályozzák a perisztaltikus reflex leszálló, gátló fázisát. Alapvetően kétfélék lehetnek: leszálló gátló interneuronok és gátló izommotoneuronok (keret). A nyilak az axonok projekcióinak irányát jelzik (Lomax és mtsai. 2006 nyomán).

A nNOS és a VIP már a korai embrionális fejlődés során megjelenik a humán ENS-ben (Giorgio és mtsai. 1994, Timmermans és mtsai 1994, Fekete és Resch 1997, Fekete és mtsai. 2000, Hens és mtsai. 2001, Bagyánszki és mtsai. 2002b). A 12. gesztációs héten már megfigyelhető a nNOS és a VIP együttes jelenléte a myentericus neuronok sejtestében. A fejlődés előrehaladtával e két transzmitter együttes előfordulása egyre kiterjedtebbé válik a humán ENS-ben. A NO és a VIP együttes előfordulása alapján a myentericus neuronokat három csoportba lehet sorolni. A myentericus neuronok egyik csoportjában a VIP/NOS együtt fordul elő, míg másik két sejtpopulációban vagy csak a VIP, vagy csak a NOS van jelen (Bagyánszki és mtsai. 2002b).

A nNOS mennyisége a bélcsatornában az egyedfejlődés során jelentős változásokat mutat (Young és Ciampoli 1998). Ezért feltételezik, hogy a nitrerg neuronok által termelt NO nemcsak a bél motoros szabályozásában vehet részt, hanem szerepet játszhat a ENS-re jellemző plaszticitás és adaptáció kialakításában (Yunker és Gilligan 1994, Ogura és mtsai. 1996). Emellett trofikussal lehet a környező sejtekre és szabályozhatja más neuronok

túlélését és differenciálódását is a ENS fejlődése során (Ogura és mtsai. 1996, Van Ginneken és mtsai. 1998, Sandgren és mtsai. 2003).

II. CÉLKITŰZÉSEK

Az elmúlt évtizedekben sok adat gyűlt össze a ENS felépítéséről, fejlődéséről és működéséről (Gershon 1998, Taraviras és Pachnis 1999, Furness 2000), számos kérdés azonban még tisztázatlan. Különösen keveset tudunk a ENS neuronpopulációinak embrionális fejlődéséről, a végső neuronális fenotípus kialakulásának mechanizmusáról. A rendelkezésre álló irodalmi adatok főleg modellállatok vizsgálatából származnak. Az enterális idegrendszert felépítő plexusok morfológiája és neurokémiai sajátosságai azonban a különböző fajokban alapvető eltéréseket mutatnak. Ezért a humán bél fejlődése csak humán magzati minták vizsgálatával ismerhető meg (Ibba-Maneschi és mtsai. 1995; McKeown és mtsai. 2001). Ugyanakkor a humán ENS fejlődésének megismerése diagnosztikai és terápiás szempontból rendkívül fontos, hiszen számos gastrointestinalis betegség, mint például a Hirschprung-betegség szorosan összefügg a ENS fejlődésével (Sullivan 1996; Camilleri 2001).

Munkánk során a humán magzati ENS glutamáterg neuronjainak fejlődését vizsgáltuk. A CNS-ben a glutamát elsősorban mint serkentő neurotranszmitter ismert, de meghatározó szerepe van a CNS fejlődésének a szabályozásában is (Fremeau és mtsai. 2002, Herzog és mtsai. 2004). A glutamát ingerületátvitel komponensei, így a glutamát, az egyes VGLUT izoformák, vagy a különböző glutamát receptorokat expresszáló neuronok a ENS-ben is megtalálhatók (Liu és mtsai. 1997, Tong és mtsai. 2001, Tong és Kirchgessner 2003), az entericus glutamáterg rendszer magzati fejlődéséről azonban nincsenek adataink.

Munkánk során a glutamáterg neurotranszmisszió négy, immunhisztokémiai módszerekkel vizsgálható komponensének a tér- és időbeli változását követtük fejlődő humán magzati ENS-ben. Az immunreaktív neuronális elemek tér és időbeli változását kvantitatív és szemikvantitatív módszerekkel analizáltuk.

Vizsgálatainkat a 12-22. hétig tartó magzati periódusra koncentráltuk. A 12. hétre az organogenezis főbb lépései befejeződnek, kialakul a bélcső és megkezdődik a bél funkcionális érése. A 16. magzati héttől a vékonybélben megindul a perisztaltika. A 22. héten a bélnyálkahártya már a felnőttére jellemző szerkezetű, s a perisztaltika mellett a szekretomotoros működések is beindulnak. A glutamáterg rendszer fejlődését négy fő szempontból közelítettük meg:

II.1. Glutamát immunreaktív neuronok vizsgálata

Ezekben a vizsgálatokban három kérdésre kerestük a választ.

- 1. Vannak-e glutamát immunreaktív neuronok a humán magzati bélben?*
- 2. A glutamát immunpozitív neuronok egyenletesen oszlanak-e el a ganglionokban, vagy eloszlásuk mutat-e valamilyen rendezettséget?*
- 3. A glutamát immunreaktív neuronok mutatnak-e olyan jellegzetes morfológiát, ami alapján funkciójukra következtethetünk?*

II.2. Vezikuláris glutamát transzporter immunreaktív neuronok vizsgálata

Miután a glutamát immunreaktív neuronok morfológiai és szemikvantitatív vizsgálata alapján feltételeztük, hogy a glutamát, mint neurotranszmitter jelen van a humán magzati ENS-ben, a részletes fejlődéstani vizsgálatokhoz a glutamáterg neuronoknak egy sokkal specifikusabb markerét, a VGLUT immunreaktivitást vizsgáltuk. Vizsgálatainkhoz három VGLUT izoforma (VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3) ellen készített specifikus ellenanyagokat használtunk, s a különböző korú magzatok bélcsatornájának teljes hosszában alapvetően három szempont alapján követtük az immunreaktív neuronális elemek tér-és időbeli változását.

- 1. Vizsgáltuk az immunreaktív neuronális sejtestek számát és a sejtek eloszlását a ganglionokon, illetve az egyes bélszakaszokon belül.*

2. Vizsgáltuk az immunreaktív terminálisszerű struktúrák („pukták”,) valamint a varikozitások denzitását és megoszlását a különböző ganglionális kompartmentekben, a különböző magzati életkorokban és a különböző bélszakaszokban.

3. Mivel, hasonlóan a központi idegrendszerhez, a ENS-ben is szoros összefüggés van a neuronok morfológiája és funkciója között, VGLUT/HuC/HuD, VGLUT/NF, valamint VGLUT/nNOS kettős- és többesjelölés alkalmazásával elkezdtük a glutamáterg neuronok morfofunkcionális és morfokémiiai jellemzését.

II.3. Glutamát receptív neuronok vizsgálata

Ezekhez a vizsgálatokhoz azt a magzati életkort választottuk, amikor a bélcsatornában már megindult az oro-anális perisztaltika, s nagy számban találtunk VGLUT immunreaktivitást a sejtesteken és a terminálisszerű végződéseken is. E vizsgálatokban két kérdésre kerestük a választ.

1. Vannak-e glutamát receptív, NMDA receptorokat expresszáló neuronok a 18 hetes humán magzati duodénumban?

2. Melyik NMDA receptor alegység megjelenése jellemző ebben a magzati életkorban?

II.4. Az NMDA receptorokat tartalmazó neuronok kémiai kódja

Miután kettősjelöléses in situ hibridizációval patkánybélben azonosítottak olyan neuronokat, amelyekben együtt fordult elő az NMDA receptor NR1 alegység és a VIP neuropeptid mRNS (Burns és Stephens 1995), feltételezték, hogy a glutamát fontos serkentő bemenetet jelent a VIP neuronok számára. Ennek alapján két kérdés fogalmazódott meg bennünk.

1. Vajon azok a humán magzati myentericus neuronok, amelyek NMDA receptor NR1 alegység immunreaktivitást mutatnak, rendelkeznek-e VIP immunreaktivitással is?

Miután humán ENS-ben a VIP és NOS gyakran együtt fordul elő a myentericus neuronokban (Timmermans és mtsai. 1994).

2. A második kérdéünk ebben a vizsgálatsorozatban az volt, hogy vannak-e olyan NOS immunreaktív neuronok vagy esetleg olyan VIP/NOS kettősjelölt neuronok, amelyek NMDA receptor NR1 alegységet is expresszálnak?

E kérdések megválaszolásához kettős- illetve többesjelöléses immunhisztokémiai vizsgálatokat terveztünk.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérleteink során használt humán mintákat, melyek legális művi vagy spontán abortuszból származtak, a Szegedi Tudományegyetem (SZTE) Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájától kaptuk, s azokat a SZTE Általános Orvostudományi Kar Etikai Bizottságának engedélyével vizsgáltuk. Az etikai bizottság a szabályok meghozatalánál a Helsinki Deklarációban rögzítetteket vette alapul (Medical World Federation, Helsinki, 1964).

III.1. A humán vizsgálati anyag előkészítése

Kísérleteink során 14, 15, 18, 20, 22, 23 hetes humán magzatok vékonybelét használtuk. A gestációs kor meghatározását a fejtető-sarok távolság (England 1983, Moore 1989), illetve az utolsó menstruáció időpontja alapján végeztük. Minden vizsgált gestációs életkorban három magzatról vettünk mintákat (1. táblázat). A bélcsatornát foszfát pufferben átmostuk (PB; 0,05 M, pH 7,4), majd 4%-os paraformaldehid oldattal feltöltöttük. A feltöltött béldarabokat a fixáló oldatba belemerítve 4°C-on egy éjszakán keresztül fixáltuk. A fixálást követően a mintákat PB-ben átmostuk. Mivel embrionális korban az egyes bélszakaszok egyértelműen nem különíthetők el egymástól, proximálisan a pylorus záróizmot, disztálisan az ileocecalis junkciót jelöltük ki anatómiai tájékozódási pontoknak, és minden vizsgált embrionális életkorban ezekhez a tájékozódási pontokhoz viszonyítva vágtuk ki a megfelelő darabokat a vékonybélből. A vékonybél proximális (orális) részéből származó mintákat a pylorustól aboralisan 2-5 cm-re, a disztális (aborális) mintákat az ileocecalis junkciótól oralisan 2-5 cm-re vágtuk ki.

Az így kivágott vékonybélszakaszokból bélnyúzat (wholemout) preparátumokat és paraffin metszeteket készítettünk.

Gesztációs hét	A magzat külső jellemzői	Az abortusz indikációja
14	normális	trisómia 21
14	normális	trisómia 13
14	normális	pszichiátriai
15 (n=3)	normális	pszichiátriai
18 (n=3)	normális	pszichiátriai
20	hydrocephal	klinikai
20	normális	endocardialis fibroelastosis
20	normális	pszichiátriai
22	normális	szívbillentyű hiány
22	normális	Wolf-Hirschborn-szindróma
22	normális	pszichiátriai
23	normális	egykamrás magzati szindróma
23 (n=2)	normális	pszichiátriai

1. táblázat A kísérletek során használt humán magzatok jellemzői és az abortuszok indikációi. A pszichiátriai indikáció minden esetben az anya öngyilkossági kísérletére utal. A magzatok kromoszóma illetve szívfejlődési rendellenességei a bélidegrendszer fejlődésében látható változást nem okoztak.

III.2. Bélyúzat preparátumok készítése

A bélyúzat preparátum készítés során a humán magzatok beléből származó vékonybél szegmenteit sztereomikroszkóp alatt a mesenterialis határon felvágjuk, majd a nyálkahártyát és az alatta lévő kötőszövetet mikroszikkével eltávolítottuk. Ezután csipesszel

lehúztuk a körkörös simaizom réteg rostjait, ennek köszönhetően a hosszanti simaizomzat és a felszínén elhelyezkedő PM szabaddá vált.

III.3. Paraffin metszetek készítése

A paraffin metszet készítés során a humán magzatok beléből származó vékonybél szegmenteket emelkedő koncentrációjú alkoholsorozatban és xilolban víztelenítettük, majd alacsony olvadáspontú (54°C) paraffinban (Paraplast, Sigma) inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Az infiltrálódott mintákat paraffinba ágyaztuk, és a paraffin megszilárdulása után Reichert szánkamikrotómmal 9µm vastagságú metszeteket készítettünk, majd a metszeteket tárgylemezre úsztattuk. A deparaffináláshoz xilolt és csökkenő koncentrációjú alkoholsorozatot használtunk.

III.4. Immunhisztokémiai festések

Glutamát, VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3, NMDA receptor alegységek, NOS, VIP, neurofilament 200 és neuronális HuC/HuD ellen termeltetett ellenanyagok felhasználásával egyszeres és többszörös immunjelöléseket alkalmaztunk a paraffin metszeteken és a bélnyúzat preparátumokon. Előinkubációhoz és minden egyes ellenanyag-hígítás készítéséhez normál szérum hígítót használtunk. A normál szérum hígító 0,1% BSA-t (borjú szérum albumin), 10% normál kecske szérumot, Triton X 100-at és 0,05 M PB-t tartalmazott. Mind a paraffin metszeteket, mind a bélnyúzat preparátumokat 30 percen keresztül normál szérum hígítóban előinkubáltuk. A későbbiekben Cy3-, AMCA-, FITC-, NL 493-, NL 557-konjugált és biotinilált fajspecifikus másodlagos antitesteket, harmadlagos szérumként biotinilált streptavidin tormagyökér peroxidázt használtunk. A biotinilált streptavidin tormagyökér

peroxidáz alkalmazása esetén az immunreakciót diaminobenzidin (DAB) kromogén (0,1%, 20 perc) és hidrogén-peroxid (H₂O₂) szubsztrát (0,03%, 10 perc) alkalmazásával tettük láthatóvá. Minden inkubációs lépés szobahőmérsékleten történt. Az egyes lépések között a mintákat 0,05 M PB-ben mostuk.

Az immunfestések során a 2., 3. és 4. táblázatban felsorolt szérumokat alkalmaztuk az ott megadott hígításban, hőmérsékleten, és inkubációs idővel. Az 5. és 6. táblázatban a kettős- illetve a hármásjelölések során használt szérumkombinációkat tüntettük fel.

Elsődleges szérum	Gazda	Hígítás	Inkubálási hőmérséklet, inkubálási idő	Gyártó
anti-VGLUT1	nyúl	1:500	szobahőmérséklet, 12 óra	Synaptic Systems
anti-VGLUT2	nyúl	1:500	szobahőmérséklet, 12 óra	Synaptic Systems
anti-VGLUT3	nyúl	1:500	szobahőmérséklet, 12 óra	Synaptic Systems
anti-glutamát	nyúl	1:200	szobahőmérséklet, 12 óra	Sigma
anti-NR1	nyúl	1:200	szobahőmérséklet, 12 óra	Santa Cruz Biotechnology
anti-NR1/NR2A-2D	kecske	1:200	szobahőmérséklet, 12 óra	Sigma
anti-VIP	nyúl	1:200	szobahőmérséklet, 12 óra	Sigma
anti-nNOS	egér	1:200	szobahőmérséklet, 12 óra	Sigma
anti-HuC/HuD	egér	1:500	szobahőmérséklet, 12 óra	Molecular Probes
anti-NF 200	egér	1:200	szobahőmérséklet, 12 óra	Sigma

2. táblázat Az immunhisztokémiai festésekhez alkalmazott elsődleges szérumok.

Másodlagos szérum	Hígítás	Inkubálási hőmérséklet, inkubálási idő	Gyártó
anti-nyúl biotinilált IgG	1:100	szobahőmérséklet, 6 óra	Amersham
anti-nyúl Cy3- konjugált IgG	1:100	szobahőmérséklet, 4 óra	Sigma
anti-kecske Cy3- konjugált IgG	1:100	szobahőmérséklet, 4 óra	Jackson Laboratory
anti-nyúl AMCA- konjugált IgG	1:100	szobahőmérséklet, 4 óra	Jackson Laboratory
anti-kecske FITC- konjugált IgG	1:100	szobahőmérséklet, 4 óra	Jackson Laboratory
anti-egér FITC- konjugált IgG	1:100	szobahőmérséklet, 4 óra	Jackson Laboratory
anti-nyúl IgG-NL493	1:200	szobahőmérséklet, 5 óra	R&D Systems USA
anti-egér IgG-NL557	1:200	szobahőmérséklet, 5 óra	R&D Systems USA

3. táblázat Az immunhisztokémiai festésekhez alkalmazott másodlagos szérumok.

Harmadlagos szérum	Hígítás	Inkubálási hőmérséklet, inkubálási idő	Gyártó
streptavidin tormagyökér peroxidáz	1:100	Szobahőmérséklet, 12 óra	Amersham

4. táblázat Az immunhisztokémiai festésekhez alkalmazott harmadlagos szérum.

Elsődleges szérum 1	Másodlagos szérum 1	Elsődleges szérum 2	Másodlagos szérum 2
anti-NR1	anti-kecske FITC- konjugált IgG	anti-VIP	anti-nyúl Cy3-konjugált IgG
anti-NR1	anti-nyúl AMCA- konjugált IgG	anti-nNOS	anti-egér FITC konjugált IgG
anti- VGLUT1	anti-nyúl IgG-NL493	anti-neuronális HuC/HuD	anti-egér IgG-NL557
anti- VGLUT1	anti-nyúl IgG-NL493	anti-NF 200	anti-egér IgG-NL557
anti- VGLUT1	anti-nyúl IgG-NL493	anti-nNOS	anti-egér IgG-NL557

5. táblázat A kettős jelölések során alkalmazott szérumkombinációk.

Elsődleges szérum 1	Másodlagos szérum 1	Elsődleges szérum 2	Másodlagos szérum 2	Elsődleges szérum 3	Másodlagos szérum 3
anti-VIP	anti-nyúl AMCA- konjugált IgG	anti-nNOS	anti-egér FITC- konjugált IgG	anti-NR1	anti-kecske Cy3- konjugált IgG

6. táblázat A hármas jelölések során alkalmazott szérumkombinációk.

A kontrollvizsgálatokat az elsődleges illetve a másodlagos antitestek kihagyásával, a VGLUT immunfestés esetén pedig a releváns fúziós kontrollfehérjék alkalmazásával preadszorpciós tesztel is elvégeztük Ewald és mtsai. (2006) módszere alapján (7. táblázat).

Antigén	Kód
Aminosav kapcsolt fúziós fehérje 456-560 VGLUT1	135-3P
Aminosav kapcsolt fúziós fehérje 510-582 VGLUT2	135-4P
Aminosav kapcsolt fúziós fehérje 530-589 VGLUT3	135-2P

7. táblázat A kontrollvizsgálatok során használt fúziós kontrollfehérjék.

III.5. Mikroszkópos módszerek

A megfestett bélnyúzat preparátumokat és metszeteket glicerín-PB 3:1 arányú keverékével fedtük le.

A megfestett mintákat Olympus BX60 típusú mikroszkóppal vizsgáltuk és Olympus DP70 típusú digitális kamerával fényképeztük le.

A fluoreszcensen jelölt minták esetében a megfelelő szűrők és egy HBO100 W higanygőzlámpa alkalmazásával egy Zeiss AxioCam digitális kamerával felszerelt Zeiss fluoreszcens mikroszkópot használtunk. A perikarion mérésekhez AnalySIS Pro szoftvert alkalmaztunk.

A többszörösen jelölt fluoreszcens mintákat Olympus konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

III.6. Kvantitatív analízis

A glutamát immunreaktív neuronokon végzett vizsgálatok során a neuronokat 400-szoros nagyításnál számoltuk (1 látótér területe 400-szoros nagyításnál $0,041 \text{ mm}^2$) 10-10 véletlenszerűen kiválasztott látótérben. Nagy hangsúlyt fektettünk arra, hogy a ganglionok teljes mélységében megszámoljuk a sejteket.

A VGLUT immunreaktív neuronok kvantitatív vizsgálata során minden mintából 10 digitális felvételt készítettünk, azonos méretben és felbontásban. A lefotózott területeket véletlenszerűen választottuk ki. Egy lefotózott terület mérete 400x nagyításnál $0,188 \text{ mm}^2$.

A VGLUT immunpozitív neuronok sejtmagjának koordinátáit a laboratóriumunkban kifejlesztett Plexus Pattern Analysis (PPA) nevű szoftverrel digitalizáltuk (Román és mtsai. 2004). A digitalizáció során a számítógép képernyőjén megjelenő képen az egér segítségével bejelöltük a VGLUT pozitív neuronok sejtmagját, majd a program megszámolta azokat.

III.7. Szemikvantitatív analízis

A VGLUT immunreaktív terminálisokat és varikozitásokat 15 véletlenszerűen kiválasztott ganglionban és a kiválasztott ganglionokat összekötő interganglionális rostban számoltuk meg. Nagy hangsúlyt fektettünk arra, hogy a ganglionok teljes mélységében megszámoljuk az immunreaktív struktúrákat.

III.8. Statisztikai analízis

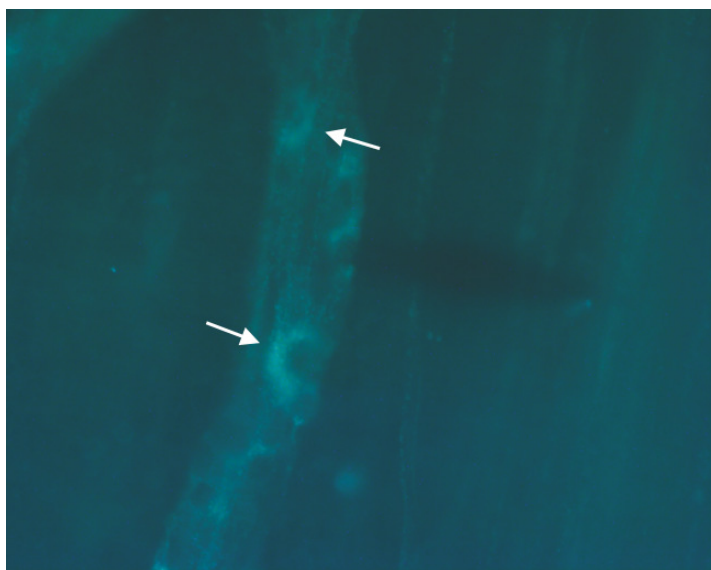
A gesztációs életkor és a VGLUT immunpozitív neuronok száma, valamint a különböző bélszakaszok és a VGLUT immunpozitív neuronok száma közötti összefüggéseket egyfaktoros varianciaanalízissel (ANOVA) vizsgáltuk. A varianciaanalízis feltételei; a random mintavétel, a függetlenség és a varienciák homogenitása teljesültek. A varianciaanalízis elvégzését követően Student-Newman-Keuls-teszttel hasonlítottuk össze a csoportokat. A statisztikai analízis során a szignifikancia szintjét $P < 0,01$ és $P < 0,001$ valószínűségi értékben határoztuk meg.

IV. EREDMÉNYEK

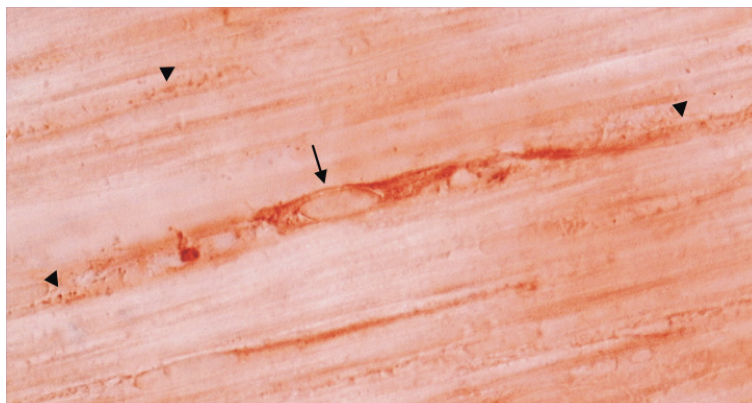
IV.1. Glutamát immunreaktív neuronok fejlődő humán bélidegrendszerben

Anti-glutamát antitest felhasználásával paraffin metszeteken és bélnyúzat preparátumokon vizsgáltuk a glutamát immunreaktív myentericus neuronok megjelenését és a neuronok ganglionon belüli eloszlását. Szemikvantitatív morfológiai módszerekkel meghatároztuk a különböző méretű neuronok százalékos arányát. A sejtek alakja, nyúlványaik száma és morfológiája alapján kísérletet tettünk a neuronok morfofunkcionális jellemzésére.

Az anti-glutamát antitest már a 15 hetes humán magzat vékonybelében specifikusan jelölt számos myentericus és submucosus neuront (9., 10. ábrák).



9. ábra Glutamát immunpozitív neuronok (nyilak) 15 hetes humán magzat plexus myentericusában.
x400



10. ábra Glutamát immunpozitív sejt (nyíl) 15 hetes humán magzat plexus submucosusában. A nyílhegyek varikózus rostokra mutatnak. x630

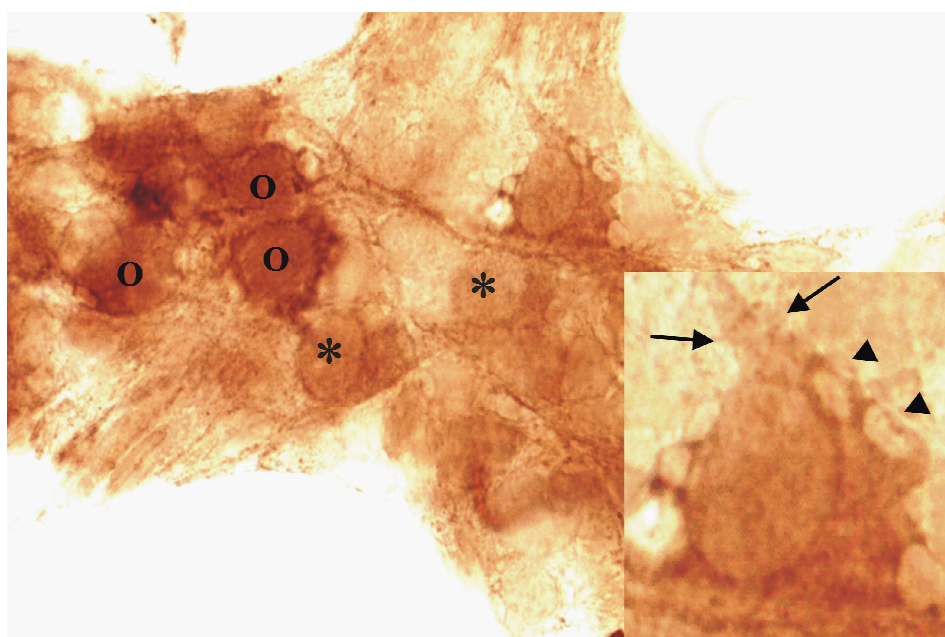
A 15 hetes humán magzat vékonybeléből készített bélnyúzat preparátumok vizsgálatával megállapítottuk, hogy a glutamát immunreaktív (IR) myentericus neuronok nem találhatók meg a vékonybél teljes hosszában, hanem csak néhány kitüntetett ganglionban csoportosultak (9. ábra).

A glutamát immunreaktivitás nemcsak a sejttestet, de a neuronok nyúlványait is láthatóvá tette, s így lehetővé vált a sejtek méret és morfológia alapon történő osztályozása (8. táblázat).

Immunreaktivitás	Immunreaktív sejtek száma/mm ²
Glutamát	320
Glu - nagy perikarion	256
Glu - kis perikarion	64

8. táblázat A bélfal egy mm²-ére eső immunreaktív sejtek száma. A glutamát immunreaktív neuronok többsége (80%) nagy perikarionnal, míg kisebb része (20%) kis, sima felszínű perikarionnal rendelkezett.

Szemikvantitatív morfometriai vizsgálataink alapján a glutamát-IR neuronokat morfológiai jellegük alapján két csoportba osztottuk. Az egyik csoport, ami a glutamát-IR sejteknek mintegy 80%-át adta, nagy sejttesttel ($128 \pm 19 \mu\text{m}^2$) (8. táblázat), néhány nagy, lamelláris dendrittel és egy hosszú axonnal rendelkező (multidendritikus, uniaxonális). Ez a morfológia leginkább a Dogiel I-es típusú neuronokra jellemző (11. ábra). A glutamát-IR neuronok másik csoportja jóval kisebb ($74 \pm 14 \mu\text{m}^2$), a sejtek felszíne sima, s egy hosszú nyúlvánnyal rendelkeztek (adendritikus) (11. ábra). Ez a sejtípus a glutamát-IR sejteknek mintegy 20%-át adta (8. táblázat). Ezek a neuronok nagy valószínűséggel a Dogiel II-es csoportba tartoznak.

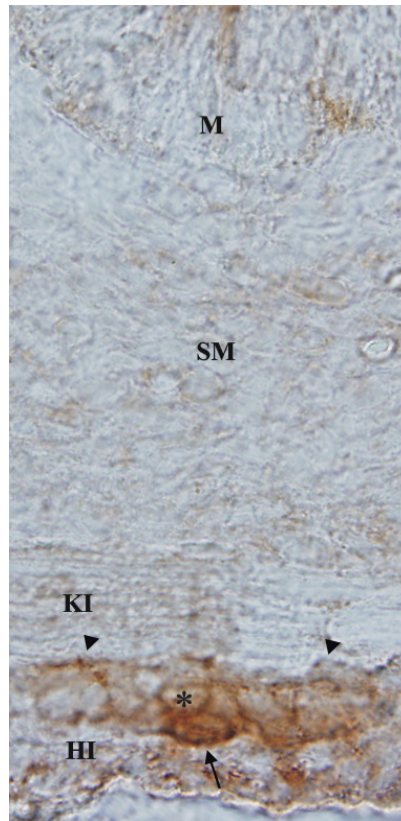


11. ábra Glutamát immunreaktív neuronok és nyúlványaik humán magzati myentericus ganglionban. A glutamát immunreaktív neuronok nagy része (körök) az inszerten kinagyítva látható számos lamelláris dendrittel (nyílhegyek) és egy axonredéssel (nyílak) rendelkezik. A glutamát immunpozitív neuronok kisebbik hányada sima felszínű (csillagok). x630, x1150 (inszert)

A submucosus ganglionok glutamát-IR sejtjei kisebb méretűek, orsó alakúak voltak (10. ábra). Az immunpozitív sejtek mellett mind a ganglionokban, mind az izomsejtek között gyakran láttunk glutamát-IR varikózus rostokat is (10. ábra).

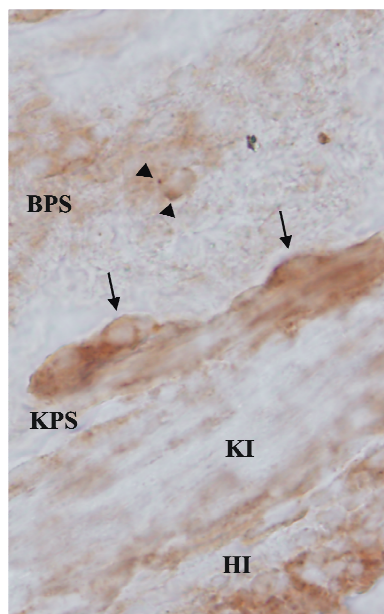
IV.2. Vezikuláris glutamát transzporter immunreaktív neuronok a fejlődő humán bélidegrendszerben

A humán magzati ENS glutamáterg neuronjainak a fejlődését a három ismert VGLUT izoforma (VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3) ellen készített specifikus ellenanyaggal végzett immunhisztokémiai festések után vizsgáltuk. A 14. és 23. magzati hét között a bélcsatorna teljes hosszában követtük az egyes izoformák immunreaktivitását. A kontroll preparátumokban, amelyeket az elsődleges vagy a másodlagos szérum elhagyásával, illetve olyan elsődleges szérummal inkubáltunk, amelyet az antigénként használt fúziós proteinnel abszorbeáltattunk, nem volt festődés. Már a 14. magzati héten mindhárom VGLUT izoforma ellen kaptunk specifikus festődést. Bár a 14. héten a myentericus ganglionok között az internodalis szegmentek még nem jelentek meg, így a ganglionok között anatómiai kapcsolat nem volt, az egyes ganglionokon belül gyakran láttunk VGLUT-IR sejttesteket és a sejttestek körül elrendeződő terminálisszerű végződéseket is (12. ábra).



12. ábra 14 hetes humán magzat vékonybeléből készült paraffin metszet VGLUT1 immunhisztokémia után. HI: hosszanti izomréteg, KI: körkörös izomréteg, SM: submucosa, M: mucosa, nyíl: VGLUT1 immunreaktív sejttest, nyílhegyek: VGLUT1 immunreaktív ponttác a sejttestek körül, csillag: neuron, mely körül immunreaktív ponttác vannak. x600

A 14. gesztációs héttől az IR neuronális elemek száma és az immunreaktivitás intenzitása fokozatosan emelkedett. A 22. magzati héttől a VGLUT1 izoformával történt immunreakció után mind a külső, mind a belső PS-ban láttunk IR neuronális elemeket. A külső PS-ban intenzíven festődő sejttesteket, az internodális szegmentekben varikózus rostokat, míg a belső PS-ban főleg a festetlen sejtek körül elhelyezkedő terminálisszerű végződéseket láttunk VGLUT-IR-t (13. ábra).

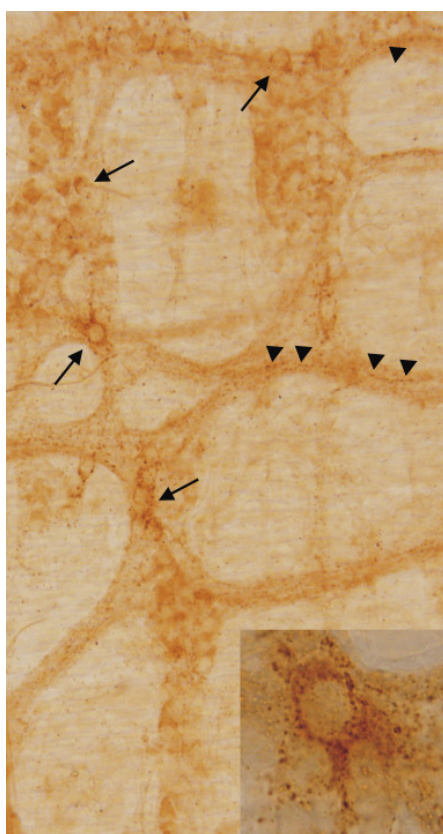


13. ábra 22 hetes humán magzat vékonybeléből készült paraffin metszet VGLUT1 immunhisztokémia után. HI: hosszanti izomréteg, KI: körkörös izomréteg, KPS: külső plexus submucosus, BPS: belső plexus submucosus. A KPS ganglionjaiban immunreaktív sejttestek (nyilak), míg a BPS ganglionjaiban a festetlen sejtek körül elrendeződő immunreaktív terminálisok (nyílhegyek) láthatóak. x400

A 18-23. gesztációs hét között a magzati bélszakaszokból már jó minőségű bélnyúzat preparátumokat tudtunk készíteni. Ezek a preparátumok alkalmasak voltak arra, hogy az immunfestés után kvantitatív és szemikvantitatív módszerekkel analizáljuk a festett sejteket, illetve a terminálisszerű struktúrákat. Mindhárom izoforma esetében jellegzetes életkor- és bélszakaszfüggő változásokat találtunk, mind a sejtek kvantitatív, mind a terminálisszerű struktúrák szemikvantitatív vizsgálata során. A neuronális elemek mintázata és megoszlása a három izoformával történő immunfestés után lényeges különbségeket mutatott a különböző magzati életkorokban és a különböző bélszakaszokban. Ezért az egyes izoformák vizsgálata során kapott eredményeket a könnyebb áttekinthetőség kedvéért a továbbiakban külön-külön tárgyalom.

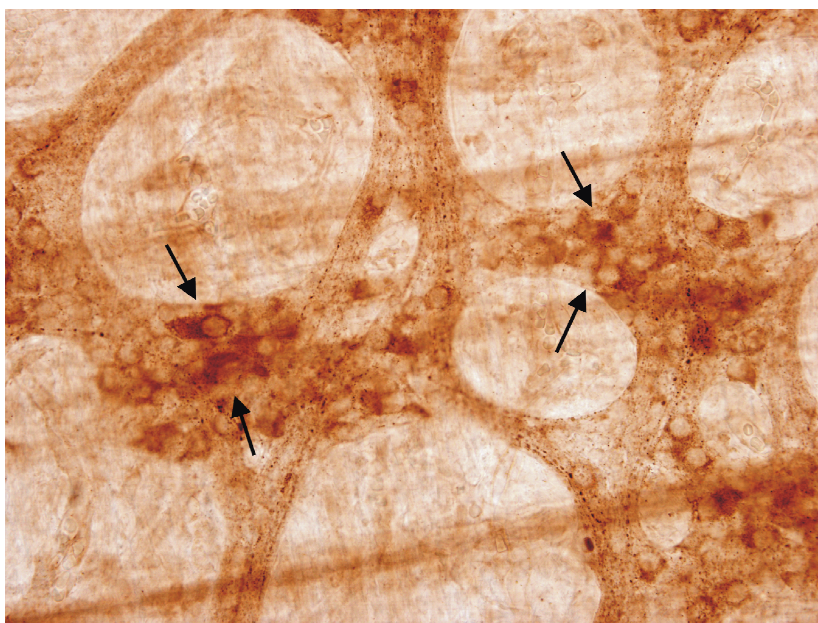
IV.2.1. A vezikuláris glutamát transzporter 1 immunreaktivitás vizsgálata

A 18-23. magzati életkorokban a vékonybél teljes hosszában nagyon erős VGLUT1-IR-t láttunk a PM minden neuronális elemében. A VGLUT1-IR jelen volt a myentericus neuronok citoplasmájában, ahol jellegzetes pontszerű festődési mintázatot mutatott (14. ábra). Emellett gyakran láttunk VGLUT1-IR terminálisszerű végződéseket a ganglionsejtek körül vagy immunreaktív varikózus rostokat a ganglionális neuropilben és az internodális szegmentek területén (14. ábra).

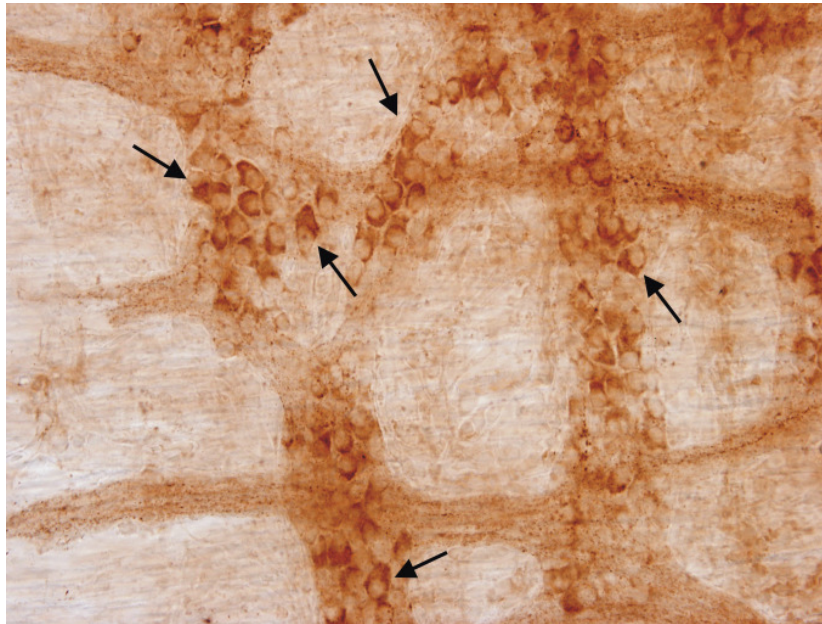


14. ábra 18 hetes humán magzat vékonybeléből készült bélnyúzat preparátum VGLUT1 immunhisztokémiai festés után. A VGLUT1 immunreaktív sejtestek (nyilak), varikózus rostok és ponttác (nyílhegyek) nagy számban vannak jelen a myentericus ganglionokban és az azokat összekötő interganglionális szakaszokban. A VGLUT1 immunreaktivitás a myentericus neuronok citoplasmájában jellegzetes pontszerű mintázatot mutat (insert, x600). x200

Bár a VGLUT1-IR myentericus neuronok a vékonybél teljes hosszában nagy számban voltak jelen, a neuronok ganglionon belüli elrendeződésében és a neuronok számában nagy különbségeket találtunk attól függően, hogy a vékonybélnek az orális, vagy az aborális részét vizsgáltuk-e. Míg a vékonybél orális szakaszában a VGLUT1-IR neuronok a ganglionon belül kisebb csoportokat alkottak (15. ábra), addig az aborális vékonybél szakaszokon az immunpozitív neuronok egyenletesen szétszóródva láthatók (16. ábra).

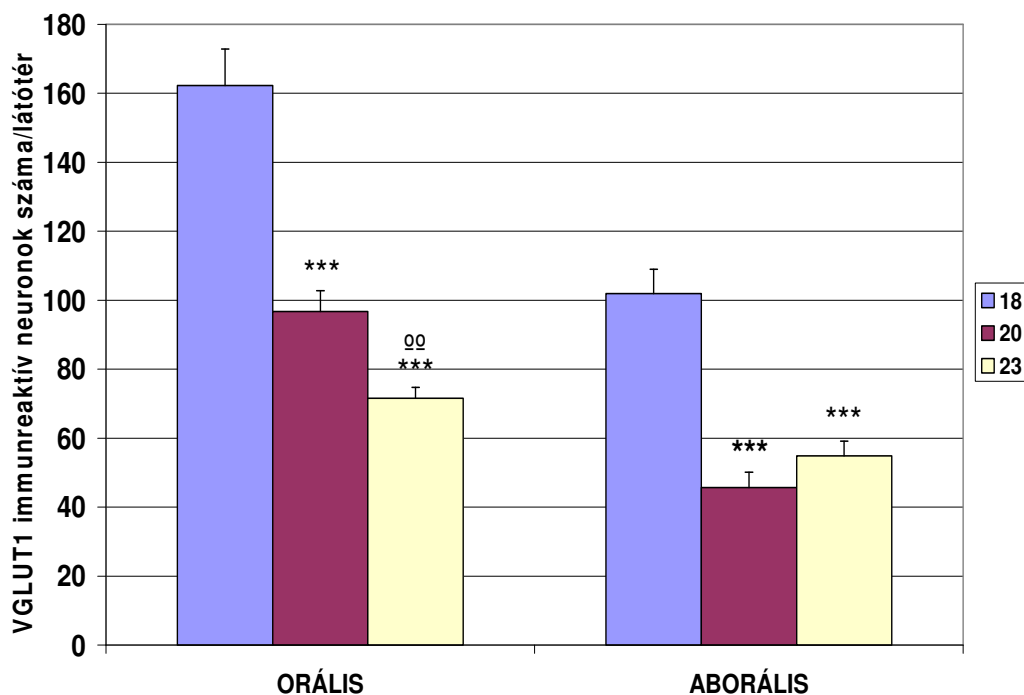


15. ábra Humán magzat vékonybelének orális szakaszából készült bélnyúzat preparátum VGLUT1 immunhisztokémiai festés után. A VGLUT1 immunpozitív neuronok (nyilak) a myentericus ganglionokon belül elkülönült csoportokat alkotnak. x400



16. ábra Humán magzat vékonybelének aborális szakaszából készült bélnyúzat preparátum VGLUT1 immunhisztokémiai festés után. A VGLUT1 immunpozitív neuronok (nyilak) a myentericus ganglionokon belül szétszóródva helyezkednek el. x400

Kvantitatív vizsgálataink során a 18-23. magzati életkorban a vékonybél orális szakaszán minden magzati életkorban magasabb VGLUT1-IR sejtszámot kaptunk, de a sejtszám életkorfüggő változásának a dinamikája is jellegzetes eltéréseket mutatott a két vizsgált bélszakaszban (17. ábra).



17. ábra VGLUT1 immunreaktív myentericus neuronok számbeli változásait bemutató oszlopdiagram a vékonybél orális és aborális szakaszában, a 18., 20. és 23. embrionális életkorokban. A 18. és a 20., valamint a 18. és a 23. hetek közötti szignifikáns változásokat csillaggal (***) $p < 0.001$), a 20. és a 23. hét közötti szignifikáns változásokat körrel (oo: $p < 0.01$) jelöltük. Látótér területe $0,188 \text{ mm}^2$.

Az orális bélszakaszon a 18. és a 20. magzati hét között a VGLUT1-IR myentericus neuronok száma 50%-kal csökkent, majd a 23. hétre ez további jelentős csökkenést mutatott. Ekkor a kiindulási neuronok számához képest már 70%-os volt a csökkenés. A 18. és 20. magzati hét között az aborális részen is hasonló, mintegy 50%-os VGLUT1-IR myentericus neuronszám-csökkenést láttunk, azonban itt a 20. héttől szignifikáns sejtszámváltozást már nem tapasztaltunk (17. ábra). A különböző ganglionális kompartmentekben (periszomatikus, ganglionális neuropil, internodális szegment) látott immunreaktív terminálisszerű végződések, „pukták” illetve varikozitások szemikvantitatív értékelésével a „puktáknak” és a varikozitásoknak egy, a vizsgált bélszakasztól és magzati életkortól függő, dinamikus változását figyeltük meg (9. táblázat).

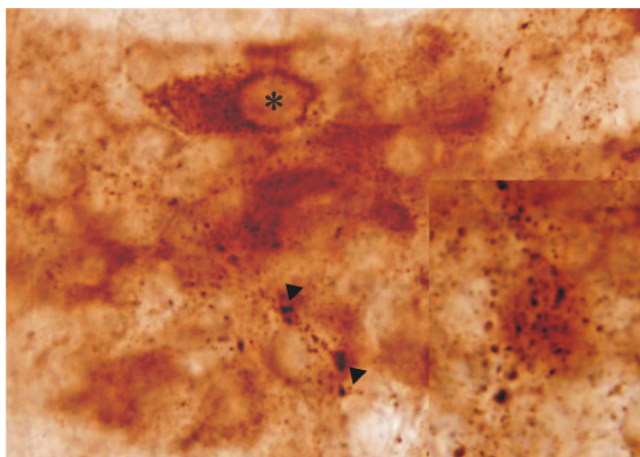
	VGLUT1		
Gesztációs hét	18.	20.	23.
ORÁLIS			
Periszomatikus	++++	+	++++
Ganglionális neuropil	++	+	+
Internodális szegment	+++	+++	+++
ABORÁLIS			
Periszomatikus	+	+	++++
Ganglionális neuropil	+	+++	+
Internodális szegment	+++	+++	+++

9. táblázat A VGLUT1 immunreaktív terminálisok és varikózus rostok denzitása a különböző korú humán magzatok vékonybelének a plexus myentericusában (+: leggyengébb immunreaktivitás, ++++: legerősebb immunreaktivitás).

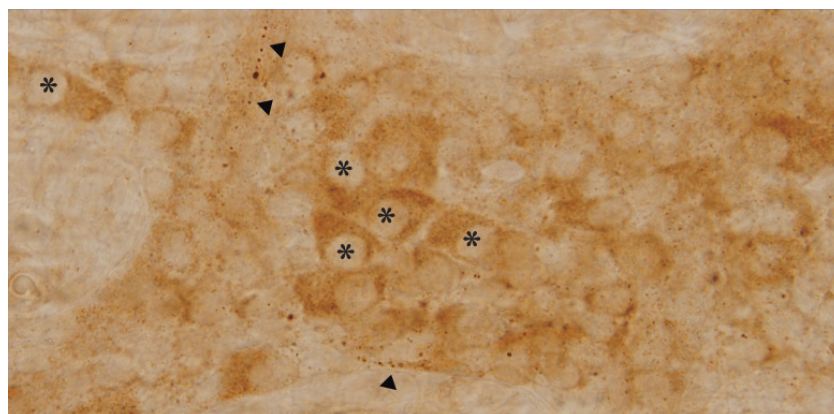
A vékonybél orális szakaszán különösen figyelemre méltó volt a periszomatikusan elhelyezkedő „pukták” gyors, hullámszerű változása. Míg a 18. magzati héten számos ganglionsejt körül láttunk sok immunreaktív „puktát”, addig a 20. magzati héten ezek száma elenyésző volt. A 23. hétre ismét igen nagy számban jelentek meg immunreaktív „pukták” periszomatikus helyzetben (9. táblázat).

Hasonlóan jelentős, egy-egy magzati életkorhoz kötött változásokat láttunk az aborális vékonybéli szakasz periszomatikusan elhelyezkedő termináliszerű végződéseiben is. A periszomatikus „pukták” száma a 18. és a 20. magzati héten elenyésző volt, a 23. magzati hétre számuk jelentősen megemelkedett (9. táblázat). A ganglionális neuropilben elhelyezkedő varikozitások számában az orális vékonybéli szakaszon nem láttunk kiemelkedő különbségeket az egyes vizsgált életkorokban (9. táblázat). Az aborális vékonybéli szakaszon azonban a 20. magzati héten jelentős átmeneti növekedést mutatott az immunreaktív varikozitások száma (9. táblázat). Emellett a magzati életkortól függetlenül figyelemre méltó bélszakasz-specifikus különbségek voltak a varikozitások ganglionon belüli

elhelyezkedésében is. Míg az orális vékonybéli szakaszon a varikózus rostok általában kosárszerűen körbevették a VGLUT-IR myentericus neuronokat (18. ábra), addig az aborális vékonybéli szakaszon ilyen varikózus kosarakat egyáltalán nem láttunk (19. ábra).



18. ábra VGLUT1 immunreaktív neuronok (csillag) 18 hetes humán magzat orális vékonybelének plexus myentericusában. A VGLUT1 immunpozitív varikózus rostok és „pukták” a VGLUT1 immunreaktív neuronok sejttestei köré rendeződnek (nyílhegyek) és gyakran kosárszerűen körbeveszik a neuronokat (inszert). x600

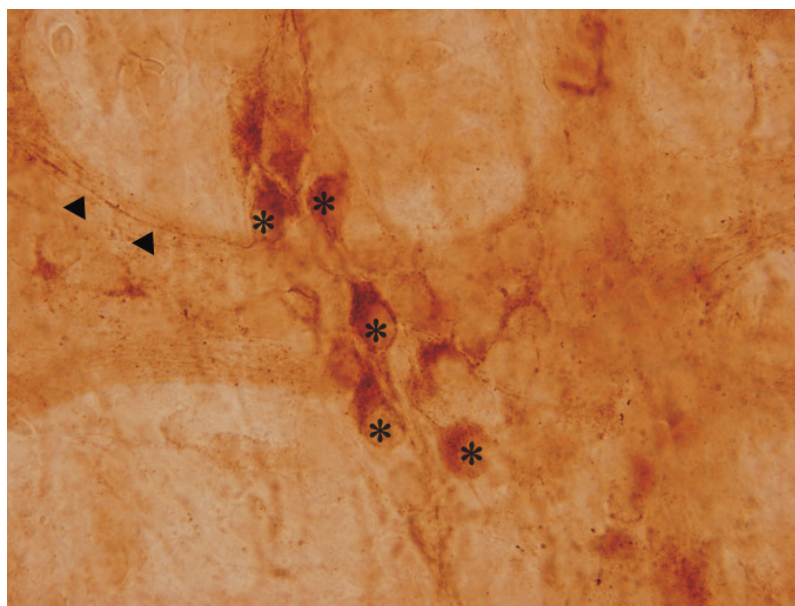


19. ábra VGLUT1 immunreaktív neuronok (csillagok) és varikózus rostok (nyílhegyek) 20 hetes humán magzat vékonybelének myentericus plexusában. A VGLUT1 immunpozitív neuronok sejttestei körül nem láthatóak VGLUT1 immunpozitív terminálisok és „pukták”. x600

Az internodális szegmentekben megfigyelt VGLUT1-IR varikozitások száma sem az egyes magzati életkorokban, sem a különböző bélszakaszokban nem változott (9. táblázat).

IV.2.2. A vezikuláris glutamát transzporter 2 immunreaktivitás vizsgálata

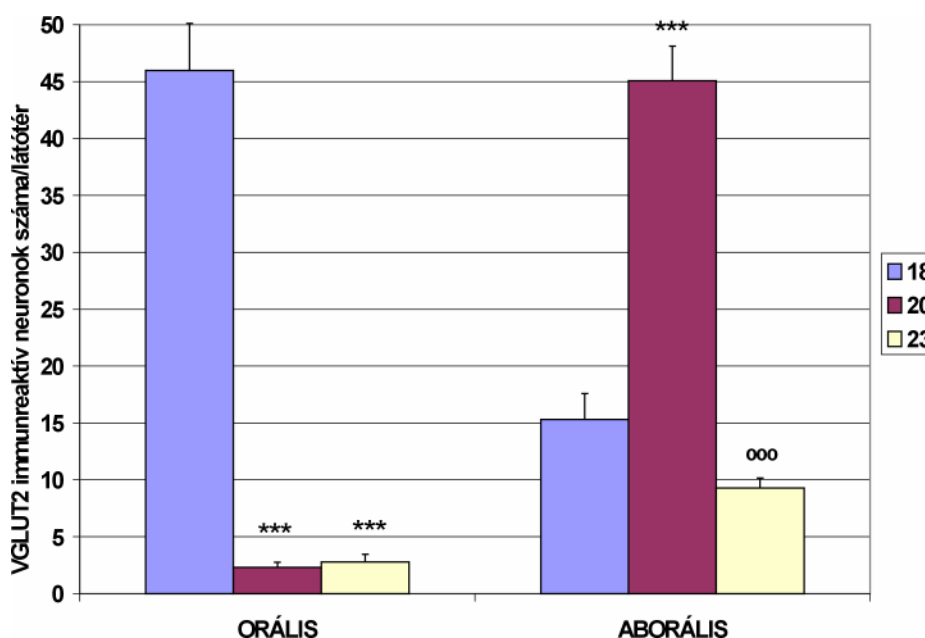
Hasonlóan a VGLUT1 immunreaktivitáshoz, a 18-23 magzati hét között a VGLUT2 immunreaktivitás is jelen volt a myentericus neuronok citoplazmájában és a különböző ganglionális kompartmentekben. A VGLUT2-IR neuronális elemek száma és az immunreaktivitás intenzitása azonban minden vizsgált magzati életkorban és minden bélszakaszban alacsonyabb volt, mint azt a VGLUT1-IR esetében láttuk. A myentericus neuronok citoplazmájában a VGLUT2-IR is jellegzetes pontszerű festődési mintázatot mutatott (20. ábra).



20. ábra 20 hetes humán magzat vékonybeléből készült bélnyúzat preparátum VGLUT2 immunhisztokémiai festés után. A fejlődő humán magzat plexus myentericusában VGLUT2 immunreaktív neuronok (csillagok) és varikózus rostok (nyílhegyek) is vannak. x1000

A VGLUT2-IR neuronális sejtestek ganglionon belüli elrendeződésében nem láttunk sem életkortól, sem bélszakasztól függő különbségeket. A neuronok minden esetben kisebb, elkülönült sejtszortokat alkottak a myentericus ganglionokon belül (20. ábra).

Kvantitatív immunhisztokémiai vizsgálataink eredményei azt mutatták, hogy a VGLUT2-IR neuronok sokkal kisebb számban voltak jelen a magzati ENS-ben, mint a VGLUT1-IR neuronok, de számuk a vizsgált bélszakasztól és a magzati életkortól függően dinamikusan változott. A változás dinamikája alapvetően különbözött attól, amit a VGLUT1-IR neuronok esetében láttunk (21. ábra).



21. ábra VGLUT2 immunreaktív myentericus neuronok számbeli változásait bemutató oszlopdiagram a vékonybél orális és aborális szakaszában, a 18., 20. és 23. embrionális életkorokban. A 18. és a 20., valamint a 18. és a 23. hetek közötti szignifikáns változásokat csillaggal (***) $p < 0.001$), a 20. és a 23. hét közötti szignifikáns változásokat körrel (ooo: $p < 0.001$) jelöltük. Látótér területe $0,188 \text{ mm}^2$.

Az orális vékonybéli szakaszon jelentős számú VGLUT2-IR neuront csak a 18. magzati héten láttunk. Az immunreaktív sejtek száma a 18. és 20. magzati hét között 90%-kal csökkent, s ezen az alacsony szinten maradt a 23. héten is (21. ábra). Az aborális vékonybéli

szakaszon ugyanakkor a 18. és 20. magzati hét között 80%-os sejtszámnövekedést láttunk, de a jelölt sejtek száma a 23. magzati hétre újra jelentősen lecsökkent (21. ábra). A különböző ganglionális kompartmentekben látott IR „pukták” és varikozitások száma az orális vékonybéli szakaszokban minden magzati életkorban alacsony volt (10. táblázat).

	VGLUT2		
Gesztációs hét	18.	20.	23.
ORÁLIS			
Periszomatikus	+	++	+
Ganglionális neuropil	++	++	++
Internodális szegment	+	+	-
ABORÁLIS			
Periszomatikus	++	+	+
Ganglionális neuropil	++	++++	+
Internodális szegment	+	+++	+

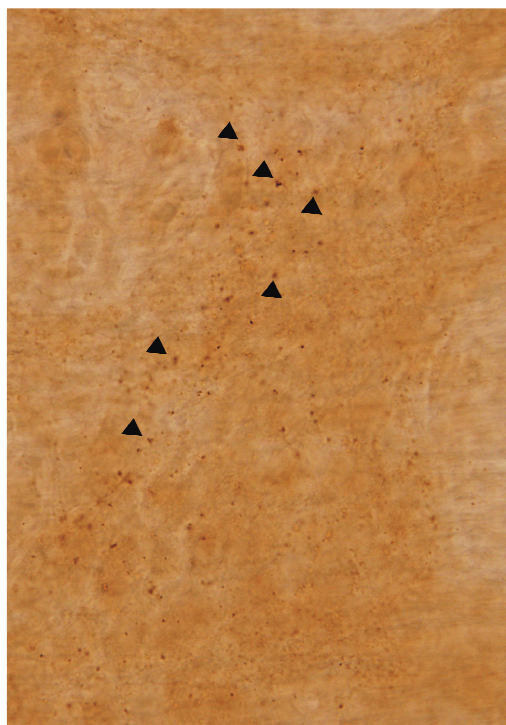
10. táblázat A VGLUT2 immunreaktív terminálisok és varikózus rostok denzitása a különböző korú humán magzatok vékonybelének plexus myentericusában (-: nincs immunreaktivitás, ++++: legmagasabb immunreaktivitás).

Jelentősebb számú varikozitást és a varikozitások számában kifejezett életkorfüggő változást csak az aborális vékonybéli szakaszon láttunk. Itt a ganglionális neuropilben és az internodális szegmentekben számolt varikozitások száma a 20. magzati héten jelentősen megnőtt, majd a 23. hétre nagyon alacsony szintre esett vissza (10. táblázat).

IV.2.3. A vezikuláris glutamát transzporter 3 immunreaktivitás vizsgálata

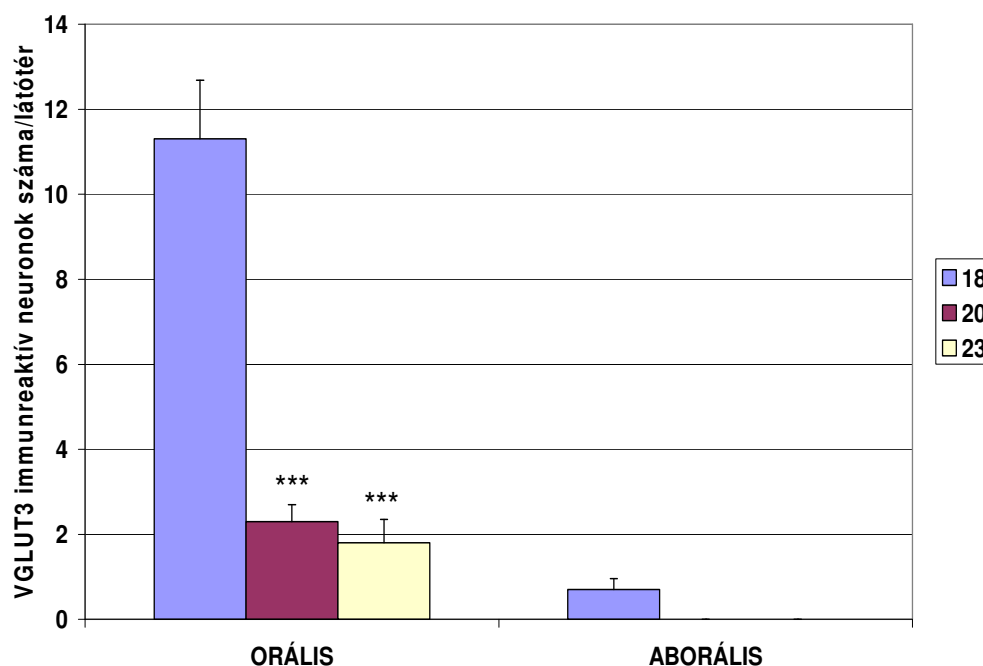
A VGLUT1 és VGLUT2 izoformához hasonlóan a VGLUT3 izoforma ellen készített antitesttel végzett immunhisztokémiai festés után is találtunk immunreaktív neuronális elemeket a 18-23 magzati hét között, a vékonybél PM-ban. Immunreaktív sejtesteket azonban

csak ritkán láttunk. A VGLUT3 festődés elsősorban a myentericus neuronok szómája körül elrendeződő terminálisszerű végződésekre valamint a ganglionális neuropil és az internodális szegmentek varikózus rostjaira korlátozódott (22. ábra).



22. ábra VGLUT3 immunreaktivitás 23 hetes humán magzat vékonybelének plexus myentericusában. Immunreaktív sejtestek nincsenek, de VGLUT3 immunpozitív „pukták” (nyílhegyek) jelentős számban láthatóak a ganglionális kompartmentekben. x600

Kvantitatív vizsgálataink során a 18. gesztációs héten a vékonybél orális szakaszának PM-ában kis számú VGLUT3-IR myentericus neuront azonosítottunk (23. ábra).



23. ábra VGLUT3 immunreaktív myentericus neuronok számbeli változásait bemutató oszlopdiagram a vékonybél orális és aborális szakaszában, a 18., 20. és 23. embrionális életkorokban. A 18. és a 20., valamint a 18. és a 23. hetek közötti szignifikáns változásokat csillaggal jelöltük (***) $p < 0.001$). Látótér területe $0,188 \text{ mm}^2$.

A magzati életkor előrehaladtával azonban a VGLUT3-IR neuronok száma fokozatosan lecsökkent, s a 20-23. magzati héten már csak néhány neuront láttunk (23. ábra). Az aborális vékonybéli szakaszon a 18. magzati hét után VGLUT3-IR neuronális sejtest már egyáltalán nem volt (23. ábra).

A különböző ganglionális kompartmentekben látott IR „punkták” és varikozitások száma minden vizsgált életkorban alacsony volt (11. táblázat), bár az orális vékonybéli szakaszon számuk az egyes magzati életkorokban változott.

	VGLUT3		
Gesztációs hét	18.	20.	23.
ORÁLIS			
Periszomatikus	++	+	+++
Ganglionális neuropil	++	++	+
Internodális szegment	++	+	-
ABORÁLIS			
Periszomatikus	+	+	+
Ganglionális neuropil	-	-	+
Internodális szegment	-	-	-

11. táblázat A VGLUT3 immunreaktív terminálisok, „pukták” és varikózus rostok denzitása a különböző korú humán magzatok vékonybelének plexus myentericusában (-: nincs immunreaktivitás, +++: legmagasabb immunreaktivitás).

A periszomatikusan elrendeződő VGLUT3-IR „pukták” száma az orális bélszakaszban a 23. gesztációs hétre megemelkedett (11. táblázat). Ugyanakkor ebben az életkorban már sem a ganglionális neuropilben, sem az internodális szegmentekben nem láttunk immunreaktív terminálisokat és varikozitásokat (11. táblázat). A VGLUT3-IR varikózus rostok száma és eloszlása a ganglionális neuropilben a 18-20. magzati hét között nem változott, de a 23. hétre az immunreaktivitás teljesen eltűnt (11. táblázat). A myentericus ganglionokat összekötő internodális szakaszokban a megfigyelt VGLUT3-IR varikózus rostok száma a gesztációs életkor előrehaladtával csökkent, és a 23. héten már nincsenek jelen VGLUT3-IR varikózus rostok az interganglionális szakaszokban (11. táblázat, 24. ábra).



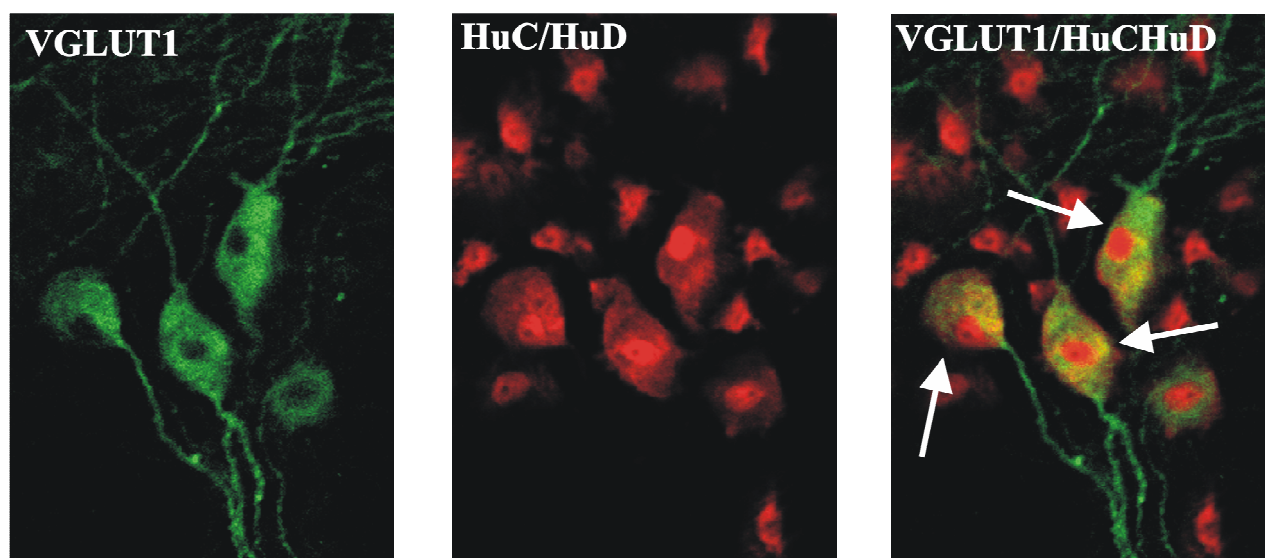
24. ábra VGLUT3 immunreaktív „pukták” (nyílhegyek) az immunreaktivitást nem mutató sejtek szómái körül 23 hetes humán magzat vékonybelének plexus myentericusában. x630

A vékonybél aborális szakaszában a VGLUT3-IR ganglionális struktúrák száma minden egyes ganglionális kompartmentben és minden gesztációs életkorban elhanyagolható volt (11. táblázat).

IV.2.4. A vezikuláris glutamát transzporter immunreaktív myentericus neuronok morfokéimiai jellemzése

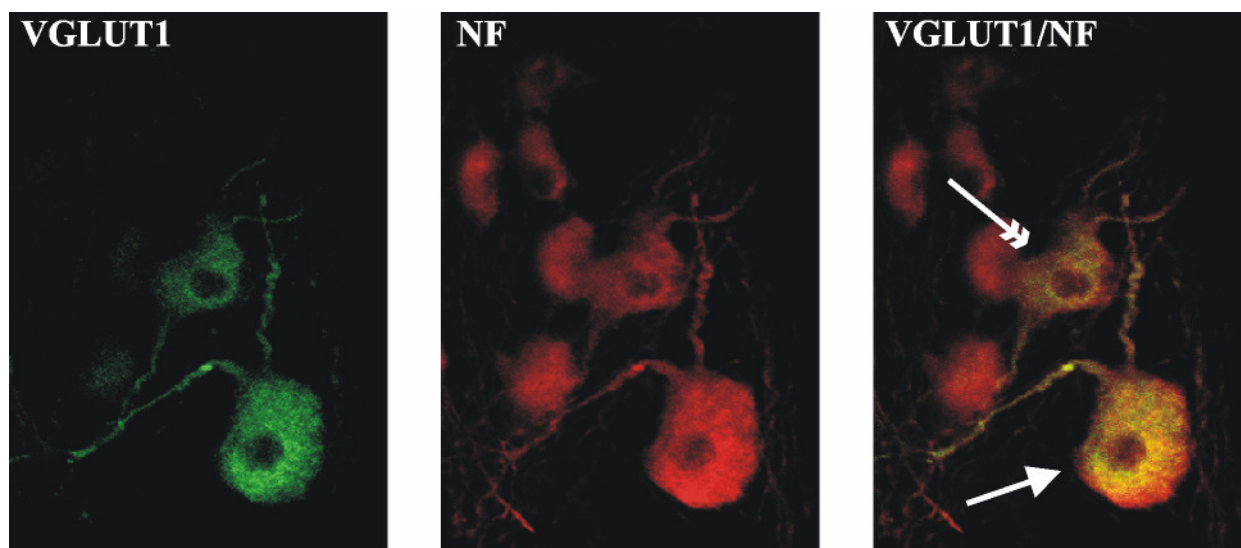
A 14-23 hetes magzati életkorokban végzett VGLUT immunhisztokémiai vizsgálataink egyértelműen bizonyították, hogy a humán magzati ENS-ben a magzati életkortól és bélszakasztól függően változó mennyiségű, de minden életkorban kiterjedt glutamáterg myentericus neuronpopuláció van jelen. Azért, hogy közelebb kerüljünk a glutamáterg neuronok funkciójának megértéséhez, elkezdjük a VGLUT1-IR sejtek morfofunkcionális és morfokéimiai jellemzését. Egy pán-neuronális (HuC/HuD), egy

neurofilament (NF200) és egy neuronális (nNOS) markerrel egyes- és többesjelöléses immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk, majd az immunreakciók után a szövetmintákat konfokális lézer scanning mikroszkóp segítségével szemikvantitatív módon értékeltük. Minden VGLUT1-IR myentericus neuron mutatott immunreaktivitást a HuC/HuD pan-neuronális marker ellen készített ellenanyaggal történő immunfestés után (25. ábra).



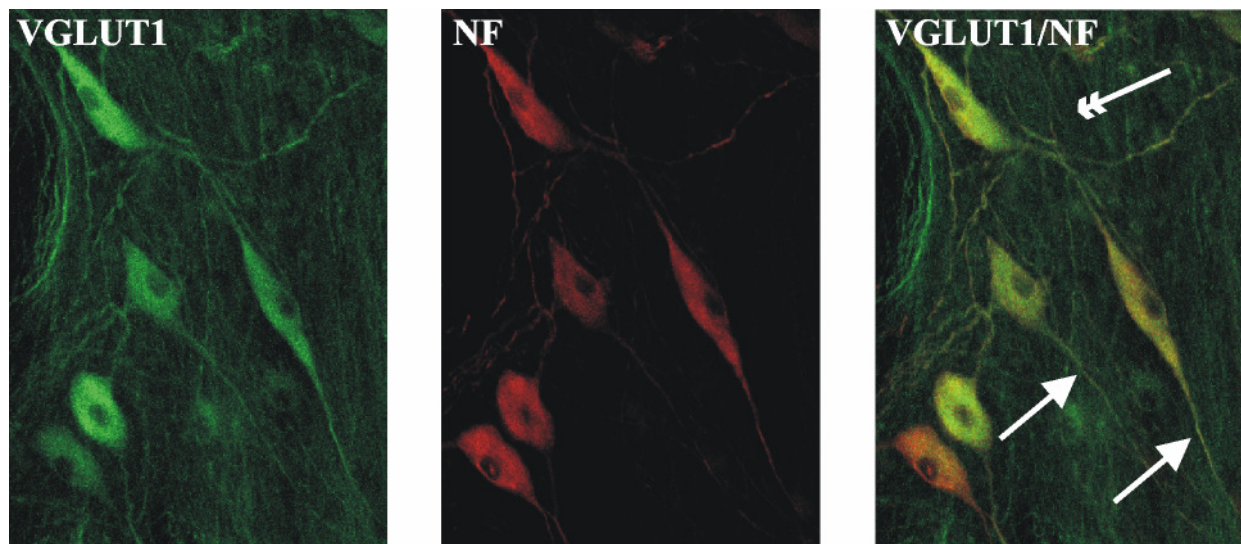
25. ábra Konfokális mikroszkópos felvételek a plexus myentericusról VGLUT1 és HuC/HuD duplajelöléses immunhisztokémiai festés után. A VGLUT1-immunpozitív neuronok mindegyike mutatott HuC/HuD immunreaktivitást is (nyilak).

Ez az eredmény megerősítette azt a feltételezésünket, hogy a VGLUT1 immunreaktivitás a ENS-ben is valós markere a glutamáterg neuronoknak. Ugyanakkor a VGLUT1-IR neuronoknak csak egy része, mintegy 35-40%-a festődött NF200-zal. A VGLUT1-IR/NF200 kettősjelölt neuronok legalább három különböző morfológiai osztályba sorolhatók. A neuronok egy része a glutamát-IR neuronok morfológiai csoportosításánál már leírt, nagyméretű, multidendritikus, uniaxonális csoportba sorolható (26. ábra).



26. ábra Konfokális mikroszkópos felvételek a plexus myentericusról VGLUT1 és neurofilament 200 duplajelöléses immunhisztokémiai festés után. A VGLUT1/NF kettősjelölt sejtek egy része nagyméretű, multidendritikus, uniaxonális neuron (kettős nyíl), míg más részük valamivel nagyobb, adendritikus, multiaxonális típusú (nyíl). x200

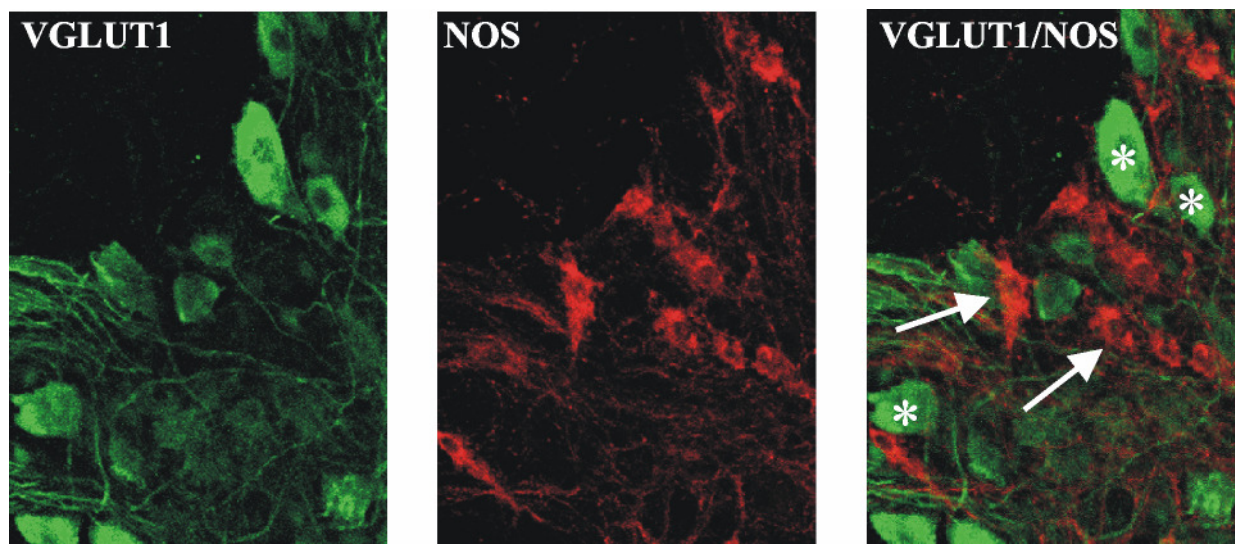
Ezeknek a sejteknek a somamérete $130\mu\text{m}^2$ körül van. A NF200-IR neuronok másik csoportja valamivel nagyobb somaméretű: $160\text{-}180\mu\text{m}^2$, s az adendritikus, multiaxonális csoportba sorolható (26. ábra).



27. ábra Konfokális mikroszkópos felvételek a plexus myentericusról VGLUT1 és neurofilament 200 duplajelöléses immunhisztokémiai festés után. A VGLUT1/NF kettősjelölt neuronoknak két nyúlványuk van, ezek közül az egyik elágazás nélküli (nyílak), míg a másik a csúcsi részén elágazik (kettős nyíl). x200

A NF200-zal jelölt VGLUT1-IR sejtek harmadik csoportjába kisebb, $60-80\mu\text{m}^2$ somaméretű neuronok tartoznak. A többnyire orsó alakú sejtek két ellentétes pólusán két nyúlvány lép ki. Az egyik a végén elágazik, míg a másik elágazás nélkül fut (27. ábra).

A VGLUT1/nNOS kettősjelölés után egyetlen VGLUT1-IR sejt sem mutatott nNOS-IR-t. A VGLUT1-IR neuronok azonban gyakran küldtek VGLUT1-IR varikózus nyúlványokat a nNOS-IR neuronokhoz (28. ábra).

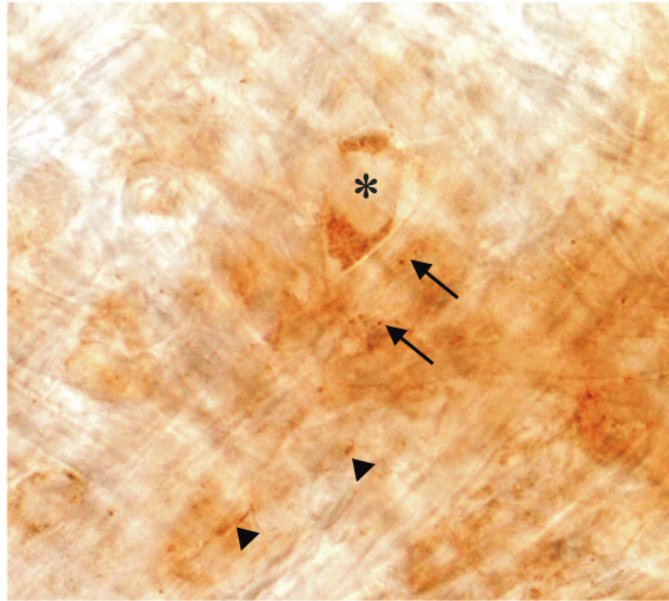


28. ábra Konfokális mikroszkópos felvételek a plexus myentericusról VGLUT1 és nNOS duplajelöléses immunhisztokémiai festés után. A VGLUT1-IR (csillagok) és a nNOS-IR (nyílak) neuronok egymástól független sejtpopulációt képeznek. A VGLUT1-IR varikózus rostok azonban gyakran veszik körbe az nNOS-IR neuronokat. x200

IV.3. Glutamát receptív myentericus neuronok vizsgálata

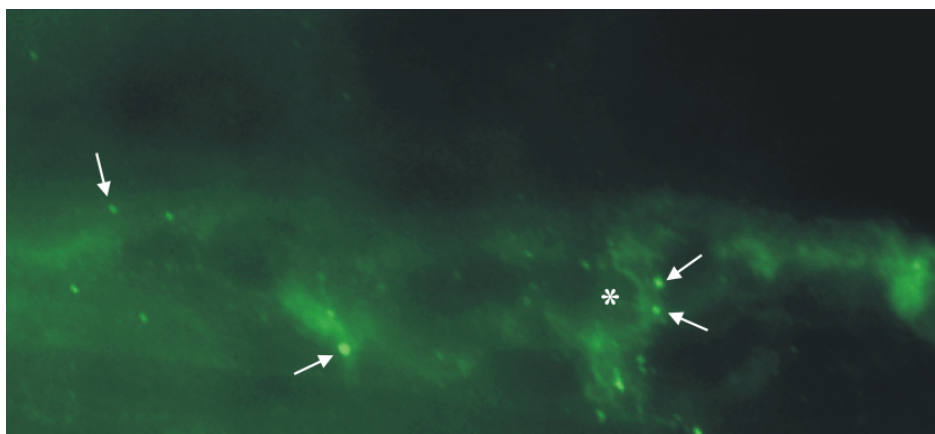
IV.3.1. NMDA receptor immunreaktív neuronok

A glutamát receptív myentericus neuronokat NMDA receptor különböző alegységei ellen készített antitestekkel vizsgáltuk 18 hetes humán magzat vékonybeléből készített paraffin metszeteken és bélnyúzat preparátumokon. Immunreaktivitást kizárólag a myentericus ganglionokban láttunk. Az NMDA receptor NR1 alegységének C terminálisa ellen készített antitest számos myentericus neuront megfestett. Az NR1 immunreaktivitás pontszerű festődést mutatott, ami főleg a sejt felszínére lokalizálódott, bár gyakran láttunk szemcsés citoplazmatikus festődést is (29. ábra).



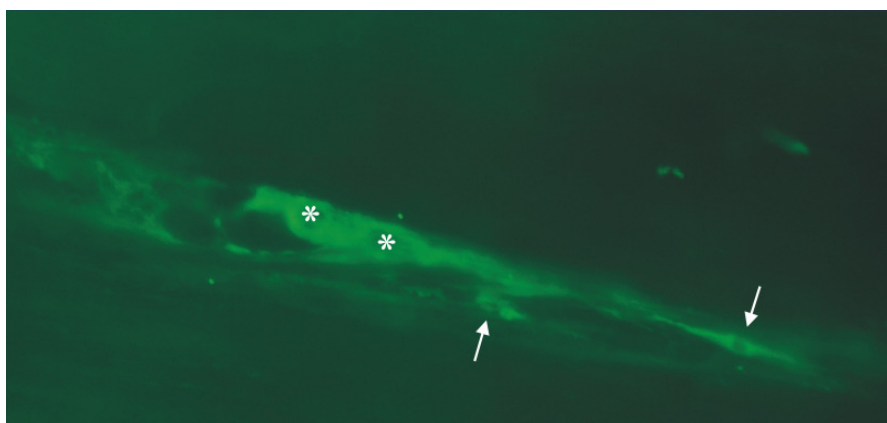
29. ábra NMDA receptor NR1 alegység immunpozítív neuronok 18 hetes humán magzat vékonybelének plexus myentericusában. Az immunreaktív szemcsék elsősorban a sejtfelszínen (nyíl) és a neuronális nyúlványokon (nyílhegy) helyezkednek el. Egy-egy sejtben az immunreaktív szemcsék a neuronok citoplazmájában koncentráálódtak (csillag). x670

Az NMDA receptor NR2 A, C és D alegysége kizárólag citoplazmatikus festődést adott, míg az NR2 B alegység jelenlétére utaló immunreaktív szemcséket gyakran láttunk pontszerűen elhelyezkedve a myentericus neuronok felszínén is (30. ábra).



30. ábra 18. hetes humán magzati vékonybélből készített paraffin metszet az NMDA receptor NR2 B alegységére végzett immunfestés után. A myentericus neuronok egy része diffúz citoplazmatikus festődést mutat (csillag). A diffúzan festődő myentericus neuronok felszínén gyakran látható jól lokalizált pontszerű festődés is (nyíl). x670

NR2 A festés után a myentericus neuronok mellett több kisebb Cajal-féle interstitialis sejtre emlékeztető sejtben is láttunk intenzív citoplazmatikus festődést (31. ábra).

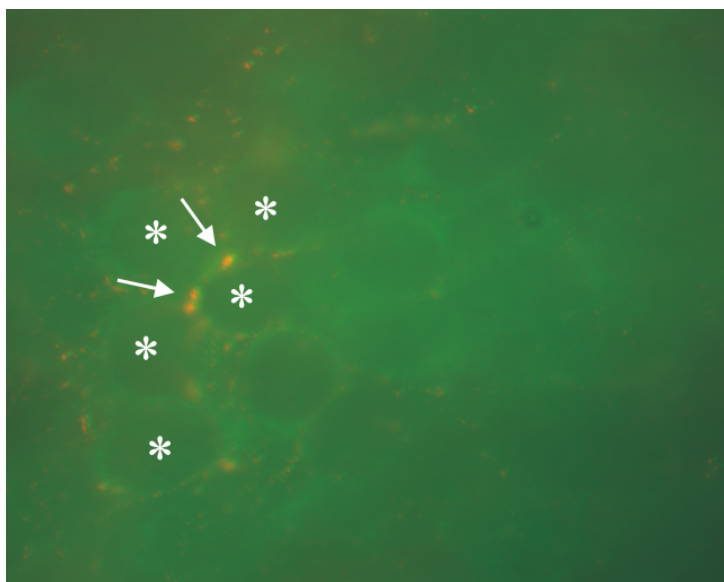


31. ábra 18 hetes humán magzat vékonybeléből készített paraffin metszet az NMDA receptor NR2 A alegységére végzett immunfestés után. Nemcsak myentericus neuronok (csillagok), de Cajal-féle interstitialis sejtekre emlékeztető sejtek (nyilak) is megfestődtek. x400

IV.3.2. A glutamát receptív neuronok kémiai kódja

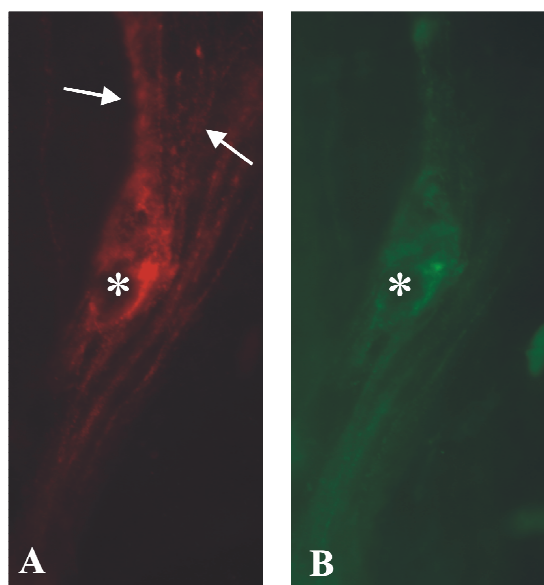
Irodalmi adatok alapján fogalmazódott meg bennünk az a kérdés, hogy vajon azok a humán magzati myentericus neuronok, amelyek NR1 NMDA receptor alegység immunreaktivitást mutatnak, rendelkeznek-e VIP, nNOS vagy esetleg együttesen mindkét jelmolekulára specifikus immunreaktivitással is. Választ keresve a kérdésre a 18 hetes humán magzatok vékonybeléből készített bélnyúzat preparátumokon NOS, VIP, valamint NOS/VIP/NMDA receptor NR1 alegység kettős- és többesjelöléses immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk.

Az NMDA receptor VIP kettős jelöléses immunhisztokémiai festés után egyes NMDA receptor immunpozitivitást mutató sejtek körül VIP pozitív varikózus rostokat és a rostok által alkotott kosarakat figyeltünk meg (32. ábra).



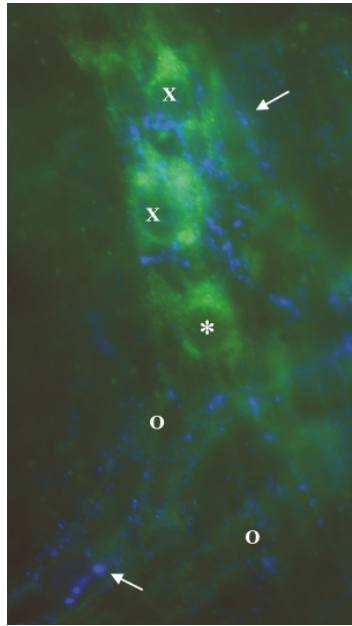
32. ábra NMDA receptor NR1 alegység és VIP kettősjelölés 18 hetes humán magzat vékonybelének plexus myentericusában. Az NMDA receptor NR1 alegység immunpozitív neuronok (csillagok) egy csoportja körül a VIP immunpozitivitást mutató varikózus rostok (nyilak) kosarakat alkotnak. x1000

A myentericus neuronoknak egy kis csoportja VIP immunpozitivitást mutatott, s a VIP-IR neuronoknak mintegy 10%-án láttunk felszíni pontszerű NMDA-NR1 immunreaktivitást és szemcsés citoplazmatikus jelölődést (33. A, B ábra).



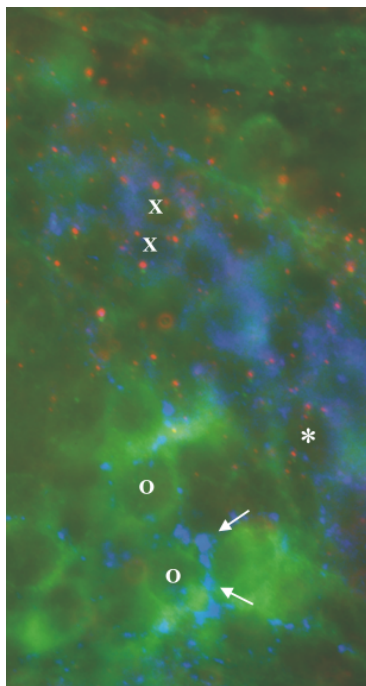
33. ábra VIP immunpozitív neuron (A) sejttestje (csillag) és nyúlványai (nyilak) a 18 hetes humán magzat vékonybelének plexus myentericusában. A sejttest NMDA receptor NR1 alegység immunreaktivitást is mutat (B). x1000

Az NMDA receptor NR1 alegység és nNOS kettősfestés után a receptor alegységet jelölő pontszerű festődés a ganglion egész területén megfigyelhető volt. A nNOS-IR sejtek NMDA receptor NR1 alegység immunreaktivitást nem mutattak (35. ábra).



34. ábra nNOS/NMDA receptor NR1 alegység kettős fluoreszcens immunfestés humán magzati vékonybélből készített wholemount preparátumon. Az NR1-pozitív szemcsés jelölés (nyíl) szétszóródva helyezkedik el a ganglionban a nNOS (csillag) és nem nNOS-immunopozitív sejtek (O) körül. A nNOS-pozitív neuronok (csillag) NMDAreceptor NR1 alegység pozitivitással nem rendelkeznek. x400

A VIP/nNOS/NMDA receptor NR1 alegység hármasselőzés után találtunk néhány olyan neuront, amelyek nNOS- és VIP-IR-t is mutattak. Ezek felszínén, úgy, mint a csak VIP-IR-t mutató neuronok felszínén NR1-pozitív szemcsék is voltak. A csak nNOS-IR-t mutató neuronok körül gyakran láttunk VIP-IR varikózus rostokat, de NR1-IR szemcséket nem (35. ábra).



35. ábra VIP/NOS/NMDA receptor NR1 alegység hármas fluoreszcens immunfestés 18 hetes humán magzati vékonybélből készített wholemount preparátumon. Az NR1-immunpozitivitás VIP-pozitív neuronális sejtestek (X) körül látható. A tisztán nNOS-pozitív neuronok (O) körül VIP-pozitív varikozitások (nyílak) figyelhetők meg, de NMDA-NR1-pozitív szemcsék nem láthatóak. A NOS/VIP kettősjelölt neuronok (csillag) körül azonban NMDA-NR1-pozitív szemcsék is megfigyelhetők. x240

V. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Laboratóriumunkban elsőként vizsgáltuk a glutamáterg neurotranszmisszió különböző komponenseinek jelenlétét, s az egyes komponensek tér- és időbeli változását a fejlődő humán ENS-ben. Munkánk célja az volt, hogy olyan immunhisztokémiai adatokat gyűjtsünk, melyekből következtetni tudunk a glutamáterg neuronok funkciójára és fejlődéstani szerepére.

V.1. Glutamát immunreaktív neuronok a fejlődő humán bélidegrendszerben

Egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a CNS legfontosabb serkentő neurotransmittere, a glutamát, a ENS-ben is fontos szerepet játszik (Kirchgessner 2001, Giaroni és mtsai. 2003).

Immunhisztokémiai vizsgálataink eredményei azt mutatták, hogy az anti-glutamát antitest már a 15 hetes humán magzat vékonybelében specifikusan jelölt számos myentericus és submucosus neuront. A glutamát-IR neuronok azonban ebben az életkorban csak néhány kitüntetett ganglionban csoportosultak. A festődő sejtek mellett mind a ganglionokban, mind az izomsejtek között gyakran láttunk glutamát-IR varikózus rostokat is. Bár feltételezzük, hogy a varikozításoknál glutamáterg neurotranszmisszió folyik, a glutamát immunreaktivitás megjelenése a korai magzati életkorban elsősorban annak trofikus hatására utal, hiszen a 15. gesztációs héten még mind a ENS-ben, mind a bélfalban jelentős morfológiai változások történnek (Fekete és mtsai. 2000, Bagyánszki és mtsai. 2002a).

Mivel az anti-glutamát antitest a sejttestek mellett a neuronok nyúlványait is láthatóvá tette, a glutamát immunfestés után lehetőségünk nyílt a sejtek méret és morfológia alapon történő osztályozására is. Bár irodalmi adatok szerint (Liu és mtsai. 1997) patkány ENS-ben a glutamáttartalmú neuronok nagy része a szekretomotoros vagy szenzoros neuronokra jellemző

Dogiel II-es morfológiát mutatott, a humán magzati PM-ban végzett szemikvantitatív morfometriai vizsgálataink szerint a glutamátot tartalmazó neuronok mintegy 80%-a nagy sejttesttel, néhány nagy, lamelláris dendrittel és egy hosszú axonnal rendelkezett. Ez a sejtmorfológia legjobban a Dogiel által leírt I-es típusú, uniaxonális, multidendritikus neuronnak felelt meg (Dogiel 1899, Stach 1981). Ezt a neurontípust disznóban a körkörös izomréteget serkentő motoneuronnak írták le (Timmermans és mtsai. 2001, Brown és Timmermans 2004).

A glutamát-IR sejtek mintegy 20%-a jóval kisebb méretű volt, sima sejtfelszínnel és egy hosszú nyúlvánnyal rendelkezett, ami a Dogiel által leírt II-es, uniaxonális neurontípusra (Dogiel 1899) emlékeztetett. A Dogiel II-es típusú neuronokat disznóban IPAN-nak tekintik (Timmermans és mtsai. 2001, Brawn és Timmermans 2004), így eredményeink összhangban állnak azokkal az irodalmi adatokkal, melyek szerint a glutamáterg neuronok egy része IPAN (Kirchgessner 2001, Furness és mtsai. 2004), s így meghatározó szerepe van a perisztaltikus reflex kialakításában.

V.2. Vezikuláris glutamát transzporter immunreaktív neuronok a fejlődő humán bélidegrendszerben

A glutamát-IR neuronok morfológiai és szemikvantitatív vizsgálata alapján feltételeztük, hogy a glutamát, mint neurotranszmitter jelen van a humán magzati ENS-ben. Mivel azonban a glutamát minden állati sejtben megtalálható, a glutamát-IR nem tekinthető a glutamáterg neuronok specifikus markerének (Otis 2001). Ezért a részletes fejlődéstani vizsgálatainkhoz a glutamáterg neuronoknak egy sokkal specifikusabb jelölését (Blaesse és mtsai. 2005), a VGLUT immunreaktivitást alkalmaztuk a fejlődő humán magzatok vékonybelének különböző szakaszaiban. Megállapítottuk, hogy a vizsgált magzati

életkorokban mindhárom VGLUT izoforma jelen volt, s az egyes izoformák életkortól és bélszakasztól függően jellegzetes kvalitatív és kvantitatív eltéréseket mutattak.

VGLUT-IR-t először a 14. magzati héten láttunk. Bár ebben az életkorban az internodális szegmentek még nem alakultak ki, az egyes ganglionokban VGLUT-IR sejttestek és a festetlen sejttestek körül immunreaktív terminálisszerű végződések is voltak. Mivel a humán magzati bélben már a 12. gesztációs héten megfigyeltek kétirányú bélmozgásokat (Stach 1989, Montgomery és mtsai. 1999), feltételezzük, hogy a 14. gesztációs héten a sejttestek körüli terminálisokban látott VGLUT-IR morfológiai bizonyítéka a korai magzati korban már működő glutamáterg neurotranszmisszióknak.

A 22. gesztációs héttől, a VGLUT1 izoformával történt immunfestés után, mind a külső, mind a belső PS-ban láttunk immunreaktív neuronális elemeket. A külső PS-ban immunreaktív sejttestek és varikózus rostok, míg a belső PS-ban a festetlen sejttestek körül elhelyezkedő immunreaktív terminálisszerű végződések voltak. Mivel a humán magzati bélcsatorna felszívóhámja a 22. gesztációs héten már morfológiailag és funkcionálisan is fejlett (Moxey és Trier 1978, Bagyánszki és mtsai. 2002a), feltételezzük, hogy a glutamáterg neurotranszmisszió már a magzati bélben szerepet játszik a szekretomotoros működések szabályozásában is.

Bár a VGLUT fehérjék elsősorban a szinaptikus vezikulák membránjában lokalizálódnak, VGLUT-IR-t nemcsak az axonokban, hanem a somatodendritikus régiókban is láttunk. Ez egyezik azokkal a megfigyelésekkel, miszerint a központi idegrendszerben a glutamáterg neuronok sejttestjeiben és dendritjeiben látott vezikulák glutamátraktárként működnek (Freneau és mtsai. 2004b, Wallén-Mackenzie és mtsai. 2006). Másrészt felveti annak a lehetőségét is, hogy hasonlóan a CNS egyes glutamáterg neuronjaihoz, a glutamát a glutamáterg myentericus neuronok somatodendritikus membránfelszínein is felszabadulhat (Seal és Edwards 2006b).

A VGLUT-IR sejttestek kvantitatív analízise, valamint a különböző ganglionális kompartmentekben (periszomatikus, ganglionális neuropil, internodális szegment) lévő immunreaktív „pukták” szemikvantitatív becslése alapján megállapítottuk, hogy a humán magzati ENS-be a VGLUT1 és a VGLUT2 tekinthető a két domináns VGLUT izoformának, mivel expressziójuk minden magzati életkorban és minden bélszakaszon kiterjedt volt. Ugyanakkor a VGLUT3 expresszió csak az orális bélszakaszokra, s ott is csak egy szűk neuronpopulációra korlátozódott. A két domináns izoforma közül a VGLUT1 expresszió kvantitatív predominanciája minden magzati életkorban és minden bélszakaszon egyértelmű volt. Az egyetlen rendelkezésre álló irodalmi adat alapján felnőtt humán ENS-ben kizárólag VGLUT2 immunreaktivitást találtak (Tong és mtsai. 2001). Hasonló, fejlődési állapothoz kötött izoformadominanciát patkány CNS-ben is leírtak. Ott az embrionális CNS-ben a VGLUT2 izoforma volt a domináns, míg posztembrionálisan az életkor előrehaladtával a VGLUT1 dominanciája lett egyre kifejezettebb (Miyazaki és mtsai. 2003). Kvantitatív és szemikvantitatív vizsgálataink alapján megállapítottuk azt is, hogy a különböző transzporterek expressziós mintázatában életkortól és bélszakasztól függően jelentős változások voltak. Ennek a funkcionális jelentőségét vizsgálataink jelenlegi fázisában nehéz pontosan felbecsülni. A CNS-ben végzett vizsgálatok alapján azonban egyértelmű bizonyítékok vannak arról, hogy az egyes VGLUT izoformák mennyisége funkcionális szempontból meghatározó (Wojcik és mtsai. 2004). Ennek ismeretében feltételezzük azt, hogy hasonlóan a CNS-hez, a funkcionálisan rendelkezésre álló glutamát mennyisége a ENS-ben is fejlődési folyamatoktól függően szabályozott (Hallberg és mtsai. 2006, Liguz-Leczna és Kramska 2007). Miután az egyes bélszakaszok eltérő időben fejlődnek, s a myentericus neuronok különböző eredetű dúlcsejtekből származnak (Neu 1989, Gershon 1999, Taravira és Pachnis 1999, Le Douarin 2004), a neuronális fejlődés ütemét itt nemcsak a magzati életkor, hanem az adott neuronnak a bélfalban elfoglalt helye is determinálja. Ezzel magyarázható az, hogy kvantitatív

és szemikvantitatív vizsgálataink során nemcsak az életkortól, de bélszakasztól függően is jelentős eltéréseket találtunk a VGLUT-IR neuronális elemek számában.

Annak érdekében, hogy közelebb kerüljünk a humán magzati PM-ban talált VGLUT-IR neuronok funkciójának megértéséhez, elkezdtük e neuronok morfokémiailag jellemzését. Egy pán-neuronális (HuC/HuD), egy neurofilament (NF200) és egy neuronális (nNOS) markerrel egyes- és többesjelöléses immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. Mivel minden VGLUT1-IR neuron egyben HuC/HuD-IR is volt, eredményeink alapján teljes biztonsággal mondhatjuk, hogy a humán magzati ENS-ben a VGLUT1 immunreaktivitás valóban specifikus markere a glutamáterg neuronoknak. A NF200-IR alkalmas arra, hogy a festődő neuronokat morfológiailag jellemezzük (Brehmer 2006). A VGLUT1-IR neuronoknak mintegy a fele NF200 immunreaktivitást is mutatott. A VGLUT1/NF200 kettősjelölt neuronokat három különböző morfológiai osztályba tudtuk sorolni. A neuronoknak mintegy 60%-a már a glutamát-IR alapján is besorolt Dogiel I-es izommotoneuronnak (Timmermans és mtsai 2001, Brawn és Timmermans 2004), míg közel 20%-a szintén az ott besorolt Dogiel II-es típusú érző vagy szekretomotoros neuronnak (Timmermans és mtsai. 2001, Brawn és mtsai. 2004) tekinthető. A neuronoknak egy harmadik csoportja morfológiailag a disznónál leírt VI-os típusra emlékeztetett (Brehmer és Stach 1998), s ennek alapján ezt a neuroncsoportot leszálló interneuronnak tekinthetnénk. A VI-os típusú neuronok azonban irodalmi adatok alapján nitrerg neuronok (Brehmer és mtsai. 2004). Humán magzati bélben ugyanakkor VGLUT1-IR nNOS-IR kettősjelölt neuronokat nem találtunk, így ezeknek a neuronoknak a morfokémiailag jellemzése még további vizsgálatokat igényel. Az egyes morfológiai neurontípusok százalékos megoszlása alapján nagy biztonsággal mondhatjuk, hogy a nem NF200-IR VGLUT1-IR neuronok lefedik a glutamát-IR neuroncsoportokat.

V.3. Glutamát receptív neuronok vizsgálata

A glutamát és a VGLUT-IR sejtek azonosítása mellett az NMDA receptor különböző alcsoportjai ellen készített szérumokkal végzett immunhisztokémiai festések során kerestük a glutamáterg transzmisszió célsejtjeit is.

Korábbi kutatások szerint a patkány ENS-ben szinte valamennyi entericus neuron NMDA receptor-pozitívnak bizonyult (Liu és mtsai. 1997). A fejlődő humán PM-ban is számos NMDA receptor-pozitív neuront találtunk, de az NMDA receptor-immunreaktivitás eloszlása a humán ENS-ben sokkal korlátozottabb és szelektívebb, mint a patkányéban. Az összes ismert NMDA receptor altípus ellen (NR1, NR2 A-D) termeltetett antitesttel történő festés után volt immunreaktivitás a magzati myentericus neuronokban. A legtöbb sejt a különböző alegységek közül az NR1 alegység ellen készült antitesttel jelölődött. Ez összhangban van azokkal az irodalmi adatokkal, amelyek szerint az NR1 alegység minden NMDA receptorban megtalálható, mivel ez az alegység létfontosságú az NMDA receptor működéséhez (Hornby 2001). Az NR1 és NR2B receptor alegységek sejtfelszínhez kötött expressziót, míg az NR2A, C és D alegységek mindig citoplazmatikus lokalizációt mutattak. Ez utóbbi alegységek újszülött állatok myentericus neuronjaira jellemzőek (Lynch és Guttman 2001). Mivel az ionotropikus receptorok jelátvivő funkciójukat csak a sejtfelszínen tudják ellátni (Roche és mtsai. 2001), és az NR2 A, C és D alegység immunreaktivitás, aminek az expressziója tipikusan a magzati életkorra jellemző (Lynch és Guttman, 2002), a humán magzati ENS-ben mindig citoplazmatikus festődést mutatott, valószínű, hogy a fejlődő humán PM-ban ezek a receptor alegységek nem célpontjai a glutamáterg neurotranszmisszióknak. A neuronális expresszió mellett Cajal-féle interstitialis sejtekhez (ICC) hasonló sejtekben (Faussone-Pellegrini 1987) is láttunk NR2 A-IR-t. Mivel az ICC-ek a bélben ritmusgeneráló sejtekként is működnek (Horowitz és mtsai. 1999, Sanders és mtsai.

2000), feltételezzük, hogy a glutamát az ICC-ekre gyakorolt hatásán keresztül is részt vesz a bélmotilitás szabályozásában.

V.4. Az NMDA receptorokat tartalmazó neuronok kémiai kódja

Mivel kettősjelöléses in situ hibridizációval patkány ENS-ben találtak olyan neuronokat, amelyek mind az NMDA receptor NR1 alegységének, mind a VIP-nek a mRNS-ét expresszálták (Burns és Stephens 1995), feltételezték, hogy a glutamát serkentő impulzusokat küldhet a VIP neuronokra. Korábbi immunhisztokémiai vizsgálatokból (Timmermans és mtsai. 1994, Bagyánszki és mtsai. 2002b) az is ismert, hogy a VIP és a NOS a magzati élet végén, illetve a felnőtt humán ENS-ben együtt fordul elő a gátló motoneuronokban, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy a csak VIP-et vagy csak nNOS-t tartalmazó, illetve e két anyagot együtt használó neuronokon vannak-e NMDA receptorok.

A vizsgált magzati életkorokban nNOS és NMDA receptor NR1 alegység immunreaktivitás együttes előfordulását nem láttuk, azonban az NMDA receptor-pozitív sejtek körül gyakran láttunk nNOS-IR és VIP-IR varikózus rostokból álló kosarakat. Ez arra utal, hogy legalábbis a korai magzati életkorban, mind a NO, mind a VIP valamilyen formában szabályozza a glutamáterg jelátviteli utaknak az NMDA receptorokon keresztül megvalósuló formáját.

A 18. magzati héten a myentericus neuronoknak mintegy 10%-ában a VIP-IR és az NR1 A-IR együtt fordult elő, ami azt jelenti, hogy a VIP-IR neuronokra érkező serkentő impulzusoknak egy része glutamát. A magzati életben felszabaduló glutamát a bélmotilitásra kifejtett hatása mellett a myentericus neuronok fejlődésében is fontos szerepet játszik. A preszinaptikus felszíneken felszabaduló glutamát aktiválja a posztzinaptikus membránokon lévő NMDA receptorokat. Az aktivált receptorok azután olyan szignalizációs folyamatokat

indítanak el, amelyek segítik az aktivált receptorokkal rendelkező neuronok túlélését, s lehetővé teszik, hogy ezek a neuronok később szinaptikus kapcsolatokat alakítsanak ki más neuronokkal (Ikonomidou és mtsai. 2000, Adams és mtsai. 2004). Az NMDA receptorok aktiválása fejlődő neuronokban különböző folyamatokat indít el, többek között aktiválja a NOS szintézist is (Ayata és mtsai. 1997). Így elképzelhető, hogy azok a VIP-IR neuronok, amelyek a 18. gesztációs héten funkcionálisan aktív NR1 receptort tartalmaznak éretlen formái a később kifejlődő leszálló motoneuronoknak, amelyek funkcionálisan érett állapotukban VIP mellett NOS-t is expresszálnak (Timmermans és mtsai. 1994, Bagyánszki és mtsai. 2002b). Hogy az érett VIP-IR-NOS-IR leszálló gátló motoneuronok valóban ezekből a korai VIP-IR-NR1-IR neuronokból fejlődnek ki, azt további vizsgálatokkal igazolnunk kell.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

VI.1. Magyar nyelvű összefoglalás

A bélidegrendszer (ENS) a perifériás idegrendszer minden más struktúrájánál komplexebb, saját reflexívvel rendelkezik, neuronjainak száma a gerincvelőt felépítő idegsejtek számához hasonló, megtalálható benne majdnem az összes ismert ingerületátvivő anyag. Ezen tulajdonságai, valamint a központi idegrendszertől (CNS) való nagyfokú függetlensége miatt a ENS-t a perifériás idegrendszer harmadik divíziójának tekintik.

Az elmúlt évtizedekben sok adat gyűlt össze a ENS felépítéséről, fejlődéséről és működéséről. A ENS neuronpopulációinak embrionális fejlődéséről azonban keveset tudunk. A CNS-ben a glutamát elsősorban, mint serkentő neurotranszmitter van jelen, de meghatározó szerepe van a CNS fejlődésének szabályozásában is. A glutamát ingerületátvitel komponensei, így a glutamát, az egyes VGLUT izoformák vagy különböző glutamát receptorokat expresszáló neuronok az ENS-ben is megtalálhatók. Az entericus glutamáterg rendszer magzati fejlődéséről azonban nincsenek adataink.

Laboratóriumunkban elsőként vizsgáltuk a glutamáterg neurotranszmisszió különböző komponenseinek jelenlétét, s az egyes komponensek tér- és időbeli változását a fejlődő humán ENS-ben. Munkánk célja az volt, hogy olyan immunhisztokémiai adatokat gyűjtsünk, melyekből következtetni tudunk a glutamáterg neuronok funkciójára és fejlődéstani szerepére.

A kísérleteinkhez használt humán mintákat a Szegedi Tudományegyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájától kaptuk, s azokat a SZTE Általános Orvostudományi Kar Etikai Bizottságának engedélyével vizsgáltuk. Vizsgálatainkat a 12-23. hétig tartó magzati periódusra koncentráltuk, és a glutamáterg rendszer fejlődését négy fő szempontból közelítettük meg:

1. Anti-glutamát antitest felhasználásával paraffin metszeteken és bélnyúzat preparátumokon vizsgáltuk a glutamát immunreaktív (IR) myentericus neuronok megjelenését, és a neuronok ganglionon belüli eloszlását. Szemikvantitatív morfológiai módszerekkel meghatároztuk a különböző méretű neuronok százalékos arányát. A sejtek alakja, nyúlványaik száma és morfológiája alapján kísérletet tettünk a neuronok morfo-funkcionális jellemzésére.

Az anti-glutamát antitest már a 15 hetes humán magzat vékonybelében specifikusan jelölt számos myentericus és submucosus neuront. A glutamát-IR neuronok azonban ebben az életkorban csak néhány kitüntetett ganglionban csoportosultak. A festődő sejtek mellett mind a ganglionokban, mind az izomsejtek között gyakran láttunk glutamát-IR varikózus rostokat is. Bár feltételezzük, hogy a varikozításoknál glutamáterg neurotranszmisszió folyik, a glutamát-IR megjelenése a korai magzati életkorban elsősorban annak trofikus hatására utal. A morfológiai vizsgálataink alapján a glutamáterg neuronoknak mintegy 80%-át a Dogiel I-es, 20%-át pedig a Dogiel II-es csoportba tudtuk sorolni. A Dogiel II-es típusú neuronokat disznóban IPAN-nak tekintik, így eredményeink összhangban állnak azokkal az irodalmi adatokkal, melyek szerint a glutamáterg neuronok egy része IPAN, s így meghatározó szerepe van a perisztaltikus reflex kialakításában.

2. Részletes fejlődéstani vizsgálatainkhoz a glutamáterg neuronoknak egy sokkal specifikusabb jelölését: a VGLUT-IR-t alkalmaztuk a fejlődő humán magzatok vékonybelének különböző szakaszaiból készített paraffin metszeteken és bélnyúzat preparátumokon. A 14. és 23. magzati hét között a bélcsatorna teljes hosszában követtük az egyes izoformák (VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3) immunreaktivitását.

Már a 14. magzati héten mind a három VGLUT izoforma ellen kaptunk specifikus festődést. A ganglionokon belül gyakran láttunk VGLUT-IR sejttesteket és a sejttestek körül elrendeződő terminálisszerű végződéseket is. A 14. gesztációs héttől az immunreaktív

neuronális elemek száma és az immunreaktivitás intenzitása fokozatosan emelkedett. A 22. magzati héttől a VGLUT1 izoformával történt immunreakció után a plexus submucosusban is láttunk immunreaktív neuronális elemeket.

A VGLUT-IR sejtestek kvantitatív analízise, valamint a különböző ganglionális kompartmentekben (periszomatikus, ganglionális neuropil, internodális szegment) lévő immunreaktív „ponttác” szemikvantitatív becslése alapján megállapítottuk, hogy a humán magzati ENS-ben a VGLUT1 és a VGLUT2 tekinthető a két domináns VGLUT izoformának, mivel expressziójuk minden magzati életkorban és minden bélszakaszon kiterjedt volt. Ugyanakkor a VGLUT3 expresszió csak az orális bélszakaszokra, s ott is csak egy szűk neuronpopulációra korlátozódott. A két domináns izoforma közül a VGLUT1 expresszió kvantitatív predominanciája minden magzati életkorban és minden bélszakaszon egyértelmű volt.

A 14-23 hetes magzati életkorokban végzett VGLUT immunhisztokémiai vizsgálataink egyértelműen bizonyították, hogy a humán magzati ENS-ben a magzati életkortól és bélszakasztól függően változó mennyiségű, de minden életkorban kiterjedt glutamáterg myentericus neuronpopuláció van jelen.

Annak érdekében, hogy közelebb kerüljünk a humán magzati PM-ban talált VGLUT-IR neuronok funkciójának megértéséhez, elkezdtük e neuronok morfológiai jellemzését. Egy pán-neuronális (HuC/HuD), egy neurofilament (NF200) és egy neuronális (nNOS) markerrel egyes- és többesjelöléses immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. Mivel minden VGLUT1-IR neuron egyben HuC/HuD-IR is volt, eredményeink alapján teljes biztonsággal mondhatjuk, hogy a humán magzati ENS-ben a VGLUT1-IR valóban specifikus markere a glutamáterg neuronoknak. A NF200-IR alkalmas arra, hogy a festődő neuronokat morfológiailag jellemezzük. A VGLUT-IR neuronoknak mintegy fele NF200-IR-t is mutatott. A neuronoknak mintegy 60%-a már a glutamát-IR alapján is besorolt Dogiel I-es

izommotoneuronnak, míg kb 20%-a szintén az ott besorolt Dogiel II-es típusú érző vagy szekretomotoros neuronnak tekinthető. A neuronoknak egy harmadik csoportja morfológiailag a disznónál leírt VI-os típusra emlékeztetett. Ennek alapján ezt a neuroncsoportot leszálló interneuronnak tekinthetnénk. A VI-os típusú neuronok azonban irodalmi adatok alapján nitrerg neuronok. Humán magzati bélben ugyanakkor VGLUT1-IR nNOS-IR kettős jelölt neuronokat nem találtunk, így ezeknek a neuronoknak a morfológiái jellemzése még további vizsgálatokat igényel.

3. A glutamát és a VGLUT-IR sejtek azonosítása mellett az NMDA receptor különböző alcsoportjai ellen készített szérumokkal végzett immunhisztokémiai festések során kerestük a glutamáterg transzmisszió célsejtjeit 18 hetes humán magzat vékonybeléből készített paraffin metszeteken és bélnyúzat preparátumokon.

Az összes ismert NMDA receptor altípus ellen (NR1, NR2 A-D) termeltetett antitesttel történő festés után volt immunreaktivitás a magzati myentericus neuronokban. A legtöbb sejt a különböző alegységek közül az NR1 alegység ellen készült antitesttel jelölődött. Ez összhangban van azokkal az irodalmi adatokkal, amelyek szerint az NR1 alegység minden NMDA receptorban megtalálható, mivel ez az alegység létfontosságú az NMDA receptor működéséhez.

4. Irodalmi adatok alapján fogalmazódott meg bennünk az a kérdés, hogy vajon azok a humán magzati myentericus neuronok, amelyek NR1 NMDA receptor alegység immunreaktivitást mutatnak, rendelkeznek-e VIP, nNOS vagy esetleg együttesen mindkét jelmolekulára specifikus immunreaktivitással is. Választ keresve a kérdésre a 18 hetes humán magzatok vékonybeléből készített bélnyúzat preparátumokon NOS, VIP, valamint NOS/VIP NMDA receptor NR1 alegység kettős- és többesjelöléses immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. A vizsgált magzati életkorokban nNOS-IR és NR1-IR együttes előfordulását nem láttuk, azonban az NMDA receptor-pozitív sejtek körül gyakran láttunk nNOS-IR és VIP-IR

varikózus rostokból álló kosarakat. Ez arra utal, hogy legalábbis a korai magzati életkorban, mind a NO, mind a VIP valamilyen formában szabályozza a glutamáterg jelátviteli utaknak az NMDA receptorokon keresztül megvalósuló formáját.

A 18. magzati héten a myentericus neuronoknak mintegy 10%-ában a VIP-IR és az NR1A-IR együtt fordult elő. Ennek alapján feltételezzük, hogy a VIP-IR neuronokra érkező serkentő információk egy részét a glutamáterg neurotranszmisszió közvetíti.

VI.2. Summary

The enteric nervous system (ENS) is more complex than all the other structures of the peripheral nervous system. It disposes of its own reflexes, the number of its neurons is similar to the number of neurons building up the spinal cord, and almost every known neurotransmitter is found in it. On account of these properties, as well as its high independence of the central nervous system, the enteric nervous system is considered to be the third division of the peripheral nervous system.

In recent decades many data have been collected about the structure, evolution and functioning of the ENS. However, little is known about the embryonic development of the neuron populations of the ENS. In the central nervous system (CNS) the glutamate occurs primarily as a neurotransmitter but it has also significant role in regulating the development of the CNS. Components of the neurotransmitter of the glutamate, like the glutamate itself, the VGLUT isoforms or neurons expressing various glutamate receptors can be found in the ENS as well. Nevertheless, data about the fetal development of the enteric glutamatergic system are not available.

In our laboratories we studied the presence of the different components of the glutamatergic neurotransmission and the time and spatial changes of these components in the developing human ENS for the first time. The goal of our work was to collect immunohistochemical data, from which we can conclude the function and the developmental role of the glutamatergic neurons.

The human samples we used through our experiments were received from the Department of Obstetrics and Gynecology, University of Szeged. The experiments were performed in full accordance with the declaration of the Medical World Federation proclaimed in Helsinki in 1964. We focused our experiments on the fetal period between the

12th and the 23rd weeks and examined the development of the glutamatergic system from four main aspects.

1. With the use of anti-glutamate antibody on paraffin sections and wholemount preparations we investigated the appearance of the glutamate immunoreactive myenteric neurons and their distribution inside the ganglion. With semiquantitative morphometric methods we determined the percental proportion of the various sized neurons. On the basis of the forms of the cells and the number and morphology of their projections we made an attempt to characterise the morphofunction of the neurons.

The anti-glutamate antibody specifically labelled several myenteric and submucosus neurons already in the 15-week-old old human fetal intestine. However, the glutamate immunoreactive (IR) neurons could be observed only in a few special ganglia. Besides the labelled cells we often observed glutamate-IR varicose fibres too, both in the ganglia and between the muscle cells. Although we assume that at the varicosities neurotransmission takes place, the occurring of the glutamate-IR at this early fetal age refers primarily to its trophic effect. On the basis of our morphometric experiments we could label 80% of the glutamatergic neurons as members of the group named Dogiel I, the rest (20%) as members of the Dogiel II group. Dogiel II-type neurons in pigs are considered to be IPAN, hence our results are in accordance with the literary data, according to which a part of the glutamatergic neurons is IPAN, and so has a determining role in developing the peristaltic reflex.

2. For detailed developmental investigation we used a much more specific marker of the glutamatergic neurons on paraffin sections and wholemount preparations of different sections of the developing human fetal intestine: VGLUT-IR. We studied the immunoreactivity of the three isoforms (VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3) in the whole length of the intestine between the 14th and the 23rd fetal week.

We observed specific labelling against all the three VGLUT isoforms already in the 14th fetal week. Inside the ganglia we often found VGLUT-IR cell bodies and terminal-like endings surrounding the cell bodies. From the 14th fetal week the number of the immunoreactive neuronal elements and the intensity of the immunoreactivity increased gradually. From the 22nd fetal week after the immunoreaction with the VGLUT1 isoform we found immunoreactive neuronal elements in the plexus submucosus as well.

On the basis of our quantitative analysis of the VGLUT-IR cells and our semiquantitative estimation of the immunoreactive puncta in the ganglionic compartments (perisomatic, ganglionic neurophil, internodal segments) we found that in the human fetal ENS VGLUT1 and VGLUT2 could be regarded as the two dominant VGLUT isoforms, because their expressions were extensive in every intestinal sections and fetal age. The expression of VGLUT3 was restricted to the oral sections of the intestine, and there only to a small neuron population. Among the two dominant isoforms the quantitative predominance of the VGLUT1 expression was definite in every intestine sections and fetal age.

The immunohistochemical examinations made between the 14th and the 23rd weeks squarely proved that in the human fetal ENS changing quantity of glutamatergic neuron population, depending on the fetal age and gut section, is present, but it is extensive in every age.

To get closer to understanding the function of the VGLUT-IR neurons found in the human fetal PM, we started the morphochemical characterisation of the VGLUT1-immunoreactive cells. We made single and multiple marking immunohistochemical investigations with a pan-neuronic (HuC/HuD), a neurofilament (NF200) and a neuronal (nNOS) marker. Since every VGLUT-IR neurons was HuC/HuD at the same time, on the basis of our results we could state with no doubt that VGLUT-IR is truly a specific marker of the glutamatergic neurons in the human fetal ENS. NF200-IR is efficient to characterise the

labelled neurons morphologically. About half of the VGLUT immunoreactive neurons showed NF200-IR as well. Some 60% of the neurons could be considered as Dogiel I muscle-motorneuron, around 20% as Dogiel II sensory or secretomotorneuron, both classified on the grounds of glutamate-IR already. A third group of the neurons reminded morphologically of type VI mentioned at pigs, according to which this neuron group could be regarded as efferent interneurons. However, on the basis of literary data, type VI neurons are nitrergic neurons. In addition, we have not found VGLUT-IR nNOS-IR double marked neurons in the human fetal gut, so the morphochemical characterisation of these neurons needs further investigations.

3. Besides identifying the glutamate and VGLUT immunoreactive cells we searched the target cells of the glutamatergic transmission receptor on paraffin sections and wholemount preparations of the 18-week old human fetal intestine, through immunohistochemical stainings with antibodies against different subclasses of the NMDA receptor.

We examined the glutamate receptive myenteric neurons with antibodies against the various subunits of the NMDA-receptor on paraffin sections and wholemount preparations from the 18-week old human fetal small intestine. Both NR1 and NR2 subunits of the NMDA receptor showed immunoreactivity in the developing human enteric nervous system.

Immunoreactivity started in the fetal myenteric neurons after staining with antibodies produced against every known receptor subtype (NR1, NR2/A-D). Among different subunits most cells gotstained by the antibody against NMDA receptor NR1 subunit. This fact is in accordance with the literary data, according to which NR1 subunit is found in every NMDA receptor, since this subunit is necessary for NMDA functioning.

4. On the basis of literary data a question arose: whether the human fetal myenteric neurons that show NMDA receptor NR1 subunit immunoreactivity possessed VIP, nNOS or maybe both immunoreactivity together. To be answered, we made NOS, VIP and NOS/VIP

NMDA receptor NR1 subunit double and multiple-labelling immunohistochemical investigations on wholemount preparations from 18-week old human fetal intestine. We did not observe coexistence of nNOS-IR and NMDA receptor NR-IR at the investigated fetal ages, however, around the NMDA receptor-positive cells we often found baskets of nNOS-IR and VIP-IR varicose fibres. This result refers to the fact that both NO and VIP somehow control the form of the glutamatergic neurotransmission, which goes through NMDA receptors.

In some 10% of the myenteric neurons VIP-IR and NMDA receptor NR1A-IR coexist in the 18th fetal week. On the basis of this fact we assume that a part of the excitatory stimulus arriving at VIP-IR neurons is transmitted by the glutamatergic neurotransmission.

VII. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- Adams SM, De Rivero Vaccari JC, Corriveau RA (2004) Pronounced cell death in the absence of NMDA receptors in the developing somatosensory thalamus. *J Neurosci* 24: 9441-9450.
- Aicher SA, Hahn B, Milner TA (2000) N-methyl-D-aspartate-type glutamate receptors are found in post-synaptic targets of adrenergic the thoracic spinal cord. *Brain Res* 856:1-11.
- Allescher HD, Kurjak M, Huber A, Trudrung P, Schusdziarra V (1996) Regulation of VIP release from rat enteric nerve terminals: evidence for a stimulatory effect of NO. *Am J Physiol* 271(4 Pt 1):G568-74.
- Auerbach L (1864) Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. *Arch Patol Anat Physiol* 30:457-460.
- Ayata C, Ayata G, Hara H, Matthews RT, Beal MF, Ferrante RJ, Endres M, Kim A, Christie RH, Waeber C, Huang PL, Hyman BT, Moskowitz MA (1997) Mechanisms of reduced striatal NMDA excitotoxicity in type 1 nitric oxide synthase knock-out mice. *J Neurosci* 17:6908-6917.
- Bagyánszki M, Kovács ÉG, Román V, Resch BÁ, Fekete É (2002a) Computer-aided morphometric analysis of the developing concentric structure of the human fetal intestinal tube. *Histol Histopathol* 17:731-737.
- Bagyánszki M, Román V, Fekete É (2000) Quantitative distribution of NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons in different segments of the developing chicken small intestine and colon. *Histochem J* 32:679-684.
- Bagyánszki M, Román V, Krecsmarik M, Resch BÁ, Fekete É (2002b) Individual distribution and colocalization of nitric oxide synthase with vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y in the developing human fetal intestine. *Acta Biol Szeged* 46:17-23.
- Beck F (2002) Homeobox genes in the gut development. *Gut* 51:450-454.
- Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen X, Smith SV, Maric D, Liu QY, Colton CA, Barker JL (1999) Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. *J Neurosci* 19:4449-4461.
- Bertrand G, Gross R, Puech R, Loubatières-Mariani MM, Bockaert J (1993) Glutamate stimulates glucagon secretion via an excitatory amino acid receptor of the AMPA subtype in rat pancreas. *Eur J Pharmacol* 237(1):45-50.
- Blaesse P, Ehrhardt S, Friauf E, Nothwang HG (2005) Developmental pattern of three vesicular glutamate transporters in the rat superior olivary complex. *Cell Tissue Res* 320(1):33-50.
- Bogers JJ, Pelckmans PA, Boeckstaens GE, De Man JG, Herman AG, Van Maercke YM (1991) The role of nitric oxide in serotonin-induced relaxations in the canine terminal ileum and ileocolonic junction. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 344:716-719.
- Boulland JL, Qureshi T, Seal RP, Rafiki A, Gundersen V, Bergersen LH, Fremerey RT Jr, Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA (2004) Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J Comp Neurol* 480(3):264-80.
- Bredt DS (1995) Molecular characterization of nitric oxide synthase. In: Vincent SR (ed) *Nitric oxide in the nervous system*. Academic Press, London San Diego New York, pp. 1-19.
- Bredt DS, Snyder SH (1994) Nitric oxide: a physiological messenger molecule. *Ann Rev Biochem* 63:175-182.

- Brehmer A, Schrödl F, Neuhuber W (1999a) Morphological classification of enteric neurons – 100 years after Dogiel. *Anat Embryol* 200:125-135.
- Brehmer A, Schrödl F, Neuhuber W, Hens J, Timmermans JP (1999b) Comparison of enteric neuronal morphology as demonstrated by DiI-tracing under different tissue-handling conditions. *Anat Embryol* 199:57-62.
- Brehmer A, Schrödl F, Neuhuber W, Tooyama I, Kimura T (2004) Co-expression pattern of neuronal nitric oxide synthase and two variants of choline acetyltransferase in myenteric neurons of porcine ileum. *J Chem Neuroanat* 27:33-41.
- Brehmer A, Stach W (1998) Regional structural differences in the neuronal composition of myenteric ganglia along the pig small intestine. *Anat Rec* 250:109-116.
- Brehmer A (2006) Structure of enteric neurons. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 186:1-91.
- Broussard DL, Li X, Pritchett DB, Lynch D, Bannermann PG, Pleasure D (1994) The expression of a NMDA receptor gene in guinea-pig myenteric plexus. *Neuroreport* 5(8):973-976.
- Brown DR, Timmermans J-P (2004) Lessons from the porcine enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 16 (Suppl 1):50-54.
- Burns GA, Stephens KE (1995) Expression of mRNA for the N-methyl-D-aspartate (NMDAR1) receptor and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) co-exist in enteric neurons of the rat. *J Auton Nerv Syst* 55:207-210.
- Burns GA, Stephens KE, Benson JA (1994) Expression of mRNA for the N-methyl-D-aspartate (NMDAR1) receptor by the enteric neurons of the rat. *Neurosci Lett* 170(1):87-90.
- Camilleri M (2001) Enteric nervous system disorders: genetic and molecular insight for the neurogastroenterologist. *Neurogastroenterol Mot* 13:277-295.
- Clerc N, Furness JB, Bornstein JC, Kunze WAA (1998) Correlation of electrophysiological and morphological characteristics of myenteric neurons of the duodenum in the guinea-pig. *Neuroscience* 82:899-914.
- Cosentino M, De Ponti F, Marino F, Giaroni C, Leoni O, Lecchini S, Frigo G (1995) N-methyl-D-aspartate receptors modulate neurotransmitter release and peristalsis in the guinea-pig isolated colon. *Neurosci Lett* 183:139-142.
- Costa M, Brookes SJ, Hennig GW (2000) Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47(Suppl IV):iv15-iv19.
- Daniels RW, Collins CA, Chen K, Gelfand MV, Featherstone DE, DiAntonio A (2006) A single vesicular glutamate transporter is sufficient to fill a synaptic vesicle. *Neuron* 49(1):11-16.
- Daniels RW, Collins CA, Gelfand MV, Dant J, Brooks ES, Krantz DE, DiAntonio A (2004) Increased expression of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter leads to excess glutamate release and a compensatory decrease in quantal content. *J Neurosci* 24(46):10466-10474.
- De Gois S, Schafer MK, Defamie N, Chen C, Ricci A, Weihe E, Varoqui Hnd Erickson JD (2005) Homeostatic scaling of vesicular glutamate and GABA transporter expression in rat neocortical circuits. *J Neurosci* 25: 7121-7133.
- Del Río JA, Martínez A, Fonseca M, Auladell C, Soriano E (1995) Glutamate-like immunoreactivity and fate of Cajal-Retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody. *Cereb Cortex* (1):13-21.
- Dogiel AS (1899) Ueber den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugethiere. *Arch Anat Physiol Anat Abt (Leipzig)* 130-158.

- Dogiel AS (1896) Zwei Arten sympatischer Nervenzellen. *Anat Anz* 11:679-687.
- Doyle AM, Roberts DJ, Goldstein AM (2004) Enteric nervous system patterning in the avian hindgut. *Dev Dyn* 229:708-712.
- Durbec PL, Larsson-Blomberg LB, Schuchardt A, Constantini F, Pachnis V (1996) Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development* 122:349-358.
- Eastwood SL, Harrison PJ (2005) Decreased expression of vesicular glutamate transporter 1 and complexin II mRNAs in schizophrenia: further evidence for a synaptic pathology affecting glutamate neurons. *Schizophr Res* 73(2-3):159-172.
- Edwards RH (2007) The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* 55(6):835-858.
- England MA (1983) Normal series of development. A color atlas of life before birth. Normal fetal development Wolfe Medical Publications Ltd. London. pp 19-29.
- Ewald P, Neuhuber WL, Raab M (2006) Vesicular glutamate transporter 1 immunoreactivity in extrinsic and intrinsic innervation of the rat esophagus. *Histochem Cell Biol* 125: 377-395.
- Faussone-Pellegrini MS (1987) Comparative study of interstitial cells of Cajal. *Acta Anat* 130:109-126.
- Fekete É, Benedeczky I, Timmermans JP, Resch BA, Scheuermann DW (1996) Sequential pattern of nerve-muscle contacts in the small intestine of developinh human fetus. *Histol Histopathol* 11:845-850.
- Fekete É, Bagyánszki M, Resch BÁ (2000) Prenatal development of the myenteric plexus in the human fetal small intestine. *Acta Biol Szeged* 44:3-19.
- Fekete É, Resch BA (1997). Density of nitrergic neurons in different segments of human fetal small intestine. *Acta Obstet Gyn Scan* 76:(167), Suppl. pp.102.
- Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheng M, Stewart CL, Morgan JI, Connor JA, Curran T (1994) Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* 13(2):325-338.
- Foster AC, Fagg GE (1984) Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptors. *Brain Res* 319(2):103-164.
- Freneau RT, Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH (2002) The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 14488-14493.
- Freneau RT, Kam K, Qureshi T, Johnson J, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA, Nicoll RA, Edwards RH (2004a) Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science* 304(5678):1815-1819.
- Freneau RT, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH (2001). The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 31: 247-260.
- Freneau RT, Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH (2004b) VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci* 27: 98-103.
- Fukuda K, Yasugi S (2002) Versatile roles for sonic hedgehog in gut development. *J Gastroenterol* 37:239-246.
- Furness JB (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 81:87-96.
- Furness JB, Costa M (1987) *The Enteric Nervous System*. Edinburgh, Churchill Livingstone.

- Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N (2004) Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol* 72:143-164.
- Gabella G (1987) The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. *Neuroscience* 22(2):737-752.
- Gabella G (1972) Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J. Anat.* 111:69-97.
- Galligan JJ (2002) Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 14(6):611-623.
- Gershon MD (1998) Neural injury, repair, and adaptation in the GI tract V. Genes, lineages, and tissue interactions in the development of the enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 275:G869-G873.
- Gershon MD (1998) *The Second Brain*. New York, Harper Collins.
- Gershon MD (1999) Második agyunk: a bélidegrendszer. *Orvostovábbképző Szemle* 4:153-167.
- Gershon MD, Chalazonitis A, Rothman TP (1993) From neural crest to bowel: Development of the enteric nervous system. *J Neurobiol* 24:199-214.
- Gershon MD (2003) Plasticity in serotonin control mechanisms in the gut. *Curr Opin Pharmacol* 3:600-607.
- Giaroni C, de Ponti F, Cosentino M, Lechini S, Frigo G (1999) Plasticity in the enteric nervous system. *Gastroenterology* 117:1438-1458.
- Giaroni C, Zanetti E, Chiravalli AM, Albarello L, Dominioni L, Capella C, Lecchini S, Frigo G (2003) Evidence for glutamatergic modulation of the cholinergic function in the human enteric nervous system via NMDA receptors. *Eur J Pharmacol* 476:63-69.
- Gillespie DC, Kim G, Kandler K (2005) Inhibitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic. *Nat Neurosci* 8(3):332-338.
- Giorgio de R, Parodi JE, Nicholas C, Brecha F, Brunicardi C, Becker JM, Go VLW, Sternini C (1994) Nitric oxide producing neurons in the monkey and human digestive system. *J Comp Neurol* 342:619-627.
- Grand RJ, Watkins JB, Torti FM (1976) Progress in gastroenterology. Development of the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 70:790-810.
- Grapin-Botton A, Melton DA (2000) Endoderm development from patterning to organogenesis. *Trends Genet* 16:124-130.
- Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* 22(13):5442-5451.
- Gras C, Vinatier J, Amilhon B, Guerci A, Christov C, Ravassard P, Giros B, El Mestikawy S (2005) Developmentally regulated expression of VGLUT3 during early post-natal life. *Neuropharmacol* 49(6):901-911.
- Grider JR, Kuemmerle JF, Jin JG (1996) 5-HT released by mucosal stimuli initiates peristalsis by activating 5-HT₄/5-HT_{1p} receptors on sensory CGRP neurons. *Am J Physiol* 270:G778-G782.
- Gudz TI, Komuro H, Macklin WB (2006) Glutamate stimulates oligodendrocyte progenitor migration mediated via an α v integrin/myelin proteolipid protein complex. *J Neurosci* 26(9):2458-2466.
- Hansen MB (2003) The enteric nervous system II: Gastrointestinal functions. *Pharmacol Toxicol* 92:249-257.

- Hallberg OE, Bogen IL, Reistad T, Haug KH, Wright MS, Fonnum F, Walaas SI (2006) Differential development of vesicular glutamate transporters in brain: An in vitro study of cerebellar granule cells. *Neurochem Int* 48: 579-585.
- Hayashi M, Otsuka M, Morimoto R, Hirota S, Yatsushiro S, Takeda J, Yamamoto A, Moriyama Y (2001) Differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) is a vesicular glutamate transporter in endocrine glutamatergic systems. *J Biol Chem* 276(46):43400-43406.
- Hayashi M, Yamada H, Uehara S, Morimoto R, Muroyama A, Yatsushiro S, Takeda J, Yamamoto A, Moriyama Y (2003) Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans. *J Biol Chem* 278(3):1966-1974.
- Hens J, Vanderwinden J-M, de Laet M-H, Scheuermann DW, Timmermans J-P (2001) Morphological and neurochemical identification of enteric neurones with mucosal projections in the human small intestine. *J Neurochem* 76:464-471.
- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 21(22):RC181.
- Herzog E, Landry M, Buhler E, Bouali-Benazzouz R, Legay C, Henderson CE, Nagy F, Dreyfus P, Giros B, El Mestikawy S (2004). Expression of vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in cholinergic spinal motoneurons. *Eur J Neurosci* 20: 1752-1760.
- Hevner RF, Neogi T, Englund C, Daza RA, Fink A (2003) Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Brain Res Dev Brain Res* 141(1-2):39-53.
- Hioki H, Fujiyama F, Taki K, Tomioka R, Furuta T, Tamamaki N, Kaneko T (2003) Differential distribution of vesicular glutamate transporters in the rat cerebellar cortex. *Neurosci* 117: 1-6.
- Hippenmeyer S, Kramer I, Arber S (2004) Control of neuronal phenotype: what targets tell the cell bodies. *Trends Neurosci* 27(8):482-488.
- Hisano S, Sawada K, Kawano M, Kanemoto M, Xiong G, Mogi K, Sakata-Haga H, Takeda J, Fukui Y, Nogami H (2002) Expression of inorganic phosphate/vesicular glutamate transporters (BNPI/VGLUT1 and DNPI/VGLUT2) in the cerebellum and precerebellar nuclei of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 107(1):23-31.
- Hornby PJ (2001) Receptors and transmission in the brain-gut axis II. Excitatory amino acid receptors in the brain gut axis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G1055-G1060.
- Horowitz B, Ward SM, Sanders KM (1999) Cellular and molecular basis for electrical rhythmicity in gastrointestinal muscles. *Annu Rev Physiol* 61:19-43.
- Ibba-Maneschi L, Martini M, Zecchi-Orlandini S, Faussone-Pellegrini MS (1995) Structural organization of enteric nervous system in human colon. *Histol Histopathol* 10:17-25.
- Ikonomidou C, Stefovskaja V, Turski L (2000) Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12885-12890.
- Ina A, Sugiyama M, Konno J, Yoshida S, Ohmomo H, Nogami H, Shutoh F, Hisano S (2007) Cajal-Retzius cells and subplate neurons differentially express vesicular glutamate transporters 1 and 2 during development of mouse cortex. *Eur J Neurosci* 26(3):615-623.
- Jankovic SM, Milovanovic D, Matovic M, Iric-Cupic V (1999) The effects of excitatory amino acids on isolated gut segments of the rat. *Pharm Res* 39(2):143-148.

- Kapur RP (2000) Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: experimental support for an evolutionary conserved model. *Dev Biol* 227:146-155.
- Kashani A, Betancur C, Giros B, Hirsch E, El Mestikawy S. (2007) Altered expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in Parkinson disease. *Neurobiol Aging* 28(4):568-578.
- Keef KD, Shuttleworth CW, Xue C, Bayguinov O, Publicover NG, Sanders KM (1994) Relationship between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in enteric inhibitory neurotransmission. *Neuropharmacol* 33(11):1303-1314.
- Keränen U, Vanhatalo S, Kiviluoto T, Kivilaakso E, Soinila S (1995) Co-localization of NADPH diaphorase reactivity and vasoactive intestinal polypeptide in human colon. *J Auton Nerv Syst* 54(3):177-183.
- Kirchgessner AL (2001) Glutamate in the enteric nervous system. *Curr Opin Pharmacol* 1:591-596.
- Kirchgessner AL, Gershon MD (1990) Innervation of the pancreas by neurons in the gut. *J Neurosci* 10:1626-1642.
- Kirkup AJ, Brunsden AM, Grundy D (2001) Receptors and transmission in the brain-gut axis: Potential for novel therapies I. Receptors on visceral afferents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G787-G794.
- Krantis A (2000) GABA in the mammalian enteric nervous system. *New Physiol Sci* 15:284-290.
- Kraus T, Neuhuber WL, Raab M (2007) Distribution of vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in the mouse esophagus. *Cell Tissue Res* 329(2):205-219.
- Kraus T, Neuhuber WL, Raab M (2004). Vesicular glutamate transporter 1 immunoreactivity in motor endplates of striated esophageal but not skeletal muscles in the mouse. *Neurosci Lett* 360: 53-56.
- Langley JN (1921) The autonomic nervous system-part 1. Heffer, Cambridge.
- Le Douarin NM (2004) The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: a long and still ongoing story. *Mech Dev* 121:1089-1102.
- Le Douarin NM, Teillet MA (1973) The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol* 30:31-48.
- Liguz-Lecznar M, Kramska JS (2007) Vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the developing mouse barrel cortex. *Int J Dev Neuroscience* 25, 107-114.
- Liu MT, Rothstein JD, Gershon MD, Kirchgessner AL (1997) Glutamatergic enteric neurons. *J Neurosci* 17(12):4764-4784.
- Lomax AE, Linden DR, Mawe GM, Sharkey KA (2006) Effects of gastrointestinal inflammation on enteroendocrine cells and enteric neural reflex circuits. *Auton Neurosci* 126-127:250-257.
- Lomax AE, Furness JB (2000) Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res* 302:59-72.
- Lowenstein CJ, Snyder SH (1992) Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 70:705-707.
- Lynch DR, Guttman RP (2001) NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Curr Drug Targets* 2(3):215-231.
- Lynch DR, Guttman RP (2002) Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 300(3):717-723.
- Manent JB, Demarque M, Jorquera I, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Aniksztejn L, Represa A (2005) A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *J Neurosci* 25(19):4755-4765.

- Manent JB, Jorquera I, Ben-Ari Y, Aniksztejn L, Represa A (2006) Glutamate acting on AMPA but not NMDA receptors modulates the migration of hippocampal interneurons. *J Neurosci* 26(22):5901-5909.
- Mashimo H, Ho XD, Huang PL, Fishman MC, Goyal RK (1996) Neuronal constitutive nitric oxide synthase is involved in murine enteric inhibitory neurotransmission. *J Clin Invest* 98(1):8-13.
- Mayer ML, Westbrook GL (1987) The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 28(3):197-276.
- McDonald JW, Johnston MV (1990) Pharmacology of N-methyl-D-aspartate-induced brain injury in an in vivo perinatal rat model. *Synapse* 6(2):179-188.
- McKeown SJ, Chow CW, Young HM (2001) Development of the submucous plexus in the large intestine of the mouse. *Cell Tissue Res* 303:301-305.
- Meissner G (1857) Über die Nerven des Darmwand. *Z Ration Med N F* 8:364-366.
- Milovanovic DR, Jankovic SM (2002) A pharmacological analysis of the contractile effects of glutamate on rat and human isolated gut smooth muscle strips. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 24(10):661-668.
- Miyazaki T, Fukaya M, Shimizu H, Watanabe M (2003) Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* 17(12):2563-2572.
- Moechars D, Weston MC, Leo S, Callaerts-Vegh Z, Goris I, Daneels G, Buist A, Cik M, van der Spek P, Kass S, Meert T, D'Hooze R, Rosenmund C, Hampson RM (2006) Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. *J Neurosci* 26(46):12055-12066.
- Montgomery RK, Mulberg AE, Grand RJ (1999) Development of the human gastrointestinal tract: Twenty years in progress. *Gastroenterology* 116:702-731.
- Monti B, Contestabile A (2000) Blockade of the NMDA receptor increases developmental apoptotic elimination of granule neurons and activates caspases in the rat cerebellum. *Eur J Neurosci* 12(9):3117-3123.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12(3):529-540.
- Moore KL (1989) The ninth to thirty-eight week human development. In: *Before we are born. Basic Embryology and birth defects*. 3rd ed. W.B. Saunders Company Philadelphia. pp 73-85.
- Mount HT, Dreyfus CF, Black IB (1993) Purkinje cell survival is differentially regulated by metabotropic and ionotropic excitatory amino acid receptors *J Neurosci* 13(7):3173-3179.
- Moxey PC, Trier JS (1978) Specialized cell types in the human fetal small intestine. *Anat Rec* 191(3):269-285.
- Nakamura K, Watakabe A, Hioki H, Fujiyama F, Tanaka Y, Yamamori T, Kaneko T (2007) Transiently increased colocalization of vesicular glutamate transporters 1 and 2 at single axon terminals during postnatal development of mouse neocortex: a quantitative analysis with correlation coefficient. *Eur J Neurosci* 26(11):3054-3067.
- Neu J (1989) Functional development of the fetal gastrointestinal tract. *Semin Perinat* 13:224-235.
- Newgreen D, Young HM (2002a) Enteric nervous system: development and developmental disturbances – Part 1. *Pediatr Dev Pathol* 5:224-247.

- Newgreen D, Young HM (2002b) Enteric nervous system: development and developmental disturbances – Part 2. *Pediatr Dev Pathol* 5:329-349.
- Ogura T, Nakayama K, Fujisawa H, Esumi H (1996) Neuronal nitric oxide synthase expression in neuronal cell differentiation. *Neurosci Lett* 204:89-92.
- Otis TS (2001) Vesicular glutamate transporters in cognition. *Neuron* 29(1):11-14.
- Phillips RJ, Hargrave SL, Rhodes BS, Zopf DA, Powley T (2004) Quantification of neurons in the myenteric plexus: an evaluation of putative pan-neuronal markers. *J Neurosci Met* 133:99-107.
- Raab M, Neuhuber WL (2004) Intraganglionic laminar endings and their relationships with neuronal and glial structures of myenteric ganglia in the esophagus of rat and mouse. *Histochem Cell Biol* 122: 445-459.
- Raab M, Neuhuber WL (2003) Vesicular glutamate transporter 2 immunoreactivity in putative vagal mechanosensor terminals of mouse and rat esophagus: indication of a local effector function? *Cell Tissue Res* 312: 141-148.
- Roberts DJ, Smith DM, Goff DJ, Tabin CJ (1998) Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. *Development* 125:2798-2801.
- Roberts DJ (2000) Molecular mechanisms of development of the gastrointestinal tract. *Dev Dyn* 219:109-120.
- Roche KW, Standley S, McCallum J, Dune LyC, Ehlers MD, Wenthold RJ (2001) Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat Neurosci* 4:794-802.
- Román V, Bagyánszki M, Krecsmarik M, Horváth A, Resch BÁ, Fekete É (2004) Spatial pattern analysis of nitrergic neurons in the developing myenteric plexus of the human fetal intestine. *Cytometry Part A* 57A:108-112.
- Román V, Krecsmarik M, Bagyánszki M, Fekete É (2001) Evaluation of the total number of myenteric neurons in the developing chicken gut using cuproline blue histochemical staining and neurofilament immunocytochemistry. *Histochem Cell Biol* 116:241-246.
- Sanders KM, Ördög T, Koh SD, Ward SM (2000) A novel pacemaker mechanism derives gastrointestinal rhythmicity. *News Physiol Sci* 15:291-298.
- Sandgren K, Lin Z, Svenningsen AF, Ekblad E (2003) Vasoactive intestinal peptide and nitric oxide promote survival of adult rat myenteric neurons in culture. *J Neurosci Res* 72(5):595-602.
- Schäfer KH, Hänsen A, Mestres P (1999) Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. *Anat Rec* 256:20-28.
- Schäfer MK, Varoqui H, Defamie N, Weihe E, Erickson JD (2002) Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem* 277(52):50734-50748.
- Schemann M, Michel K, Peters S, Bischoff SC, Neunlist M (2002) Cutting-edge technology. III. Imaging and the gastrointestinal tract: mapping the human enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282(6):G919-G925.
- Seal RP, Edwards RH (2006a) Functional implications of neurotransmitter co-release: glutamate and GABA share the load. *Curr Opin Pharmacol* 6(1):114-119.
- Seal RP, Edwards RH (2006b) The diverse roles of vesicular glutamate transporter 3. *Handb Exp Pharmacol* 175:137-150.
- Sinsky M, Donnerer J (1998) Evidence for a neurotransmitter role of glutamate in guinea pig myenteric plexus neurons. *Neurosci Lett* 258:109-112.
- Skerry TM, Genever PG (2001) Glutamate signalling in non-neuronal tissues. *Trends Pharmacol Sci* 22(4):174-181.

- Smear MC, Tao HW, Staub W, Orger MB, Gosse NJ, Liu Y, Takahashi K, Poo MM, Baier H (2007) Vesicular glutamate transport at a central synapse limits the acuity of visual perception in zebrafish. *Neuron* 53(1):65-77.
- Sprenkel R, Suchanek B, Amico C, Brusa R, Burnashev N, Rozov A, Hvalby O, Jensen V, Paulsen O, Andersen P, Kim JJ, Thompson RF, Sun W, Webster LC, Grant SG, Eilers J, Konnerth A, Li J, McNamara JO, Seeburg PH (1998) Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell* 92(2):279-289.
- Stach W (1989) A revised morphological classification of neurons in the enteric nervous system. In: Singer MV, Goebell H (eds) *Nerves and the gastrointestinal tract*. Kluwer, Lancaster, pp 29-45.
- Stach W (1981) The neuronal organization of the plexus myentericus (Auerbach) in the small intestine of the pig. II. Typ II-neurone (author's transl) *Z Mikrosk Anat Forsch* 95(2):161-182.
- Sullivan PB (1996) Hirschsprung's disease. *Arch Dis Child* 42:245-250.
- Takamori S, Malherbe P, Broger C, Jahn R (2002) Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep* 3(8):798-803.
- Takamori S (2006) VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci Res* 55(4):343-351.
- Taraviras S, Pachnis V (1999) Development of the mammalian enteric nervous system. *Curr Opin Gen Dev* 9:321-327.
- Timmermans JP, Barbiers M, Scheuermann DW, Bogers JJ, Adriaensen D, Fekete E, Mayer B, Van Marck EA, De Groodt-Lasseel MHA (1994) Nitric oxide synthase immunoreactivity in the enteric nervous system of the developing human digestive tract. *Cell Tissue Res* 275:235-245.
- Timmermans JP, Hens J, Adriaensen D (2001) Outer submucous plexus: An intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and human. *Anat Rec* 262:71-78.
- Tong Q, Kirchgessner AL (2003) Localization and function of metabotropic glutamate receptor 8 in the enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G992-G1003.
- Tong Q, Ma J, Kirchgessner AL (2001) Vesicular glutamate transporter 2 in the brain-gut axis. *Neuroreport* 12 (18):3929-3934.
- Tordera RM, Totterdell S, Wojcik SM, Brose N, Elizalde N, Lasheras B, Del Rio J (2007) Enhanced anxiety, depressive-like behaviour and impaired recognition memory in mice with reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1). *Eur J Neurosci* 25(1):281-290.
- Van Ginneken C, Van Meir F, Sommereyns G, Sys S, Weyns AA (1998) Nitric oxide synthase expression in enteric neurons during development in the pig duodenum. *Anat Embryol* 198:399-408.
- Van Kesteren RE, Spencer GE (2003) The role of neurotransmitters in neurite outgrowth and synapse formation. *Rev Neurosci* 14(3):217-231.
- Vanner S, Surprenant A (1996) Neural reflexes controlling intestinal microcirculation. *Am J Physiol* 271:G223-G230.
- Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, Geuze HJ, Südhof TC (2000) Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287(5454):864-869.

- Verstreken P, Koh TW, Schulze KL, Zhai RG, Hiesinger PR, Zhou Y, Mehta SQ, Cao Y, Roos J, Bellen HJ (2003) Synaptojanin is recruited by endophilin to promote synaptic vesicle uncoating. *Neuron* 40(4):733-748.
- Wallén-Mackenzie A, Gezelius H, Thoby-Brisson M, Nygård A, Enjin A, Fujiyama F, Fortin G, Kullander K (2006) Vesicular glutamate transporter 2 is required for central respiratory rhythm generation but not for locomotor central pattern generation. *J Neurosci* 26(47):12294-12307.
- Wells JM, Melton DA (1999) Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:393-410.
- Wilson NR, Kang J, Hueske EV, Leung T, Varoqui H, Murnick JG, Erickson JD, Liu G (2005) Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT1. *J Neurosci* 25(26):6221-6234.
- Wojcik SM, Rhee JS, Herzog E, Sigler A, Jahn R, Takamori S, Brose N, Rosenmund C (2004) An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc Natl Acad Sci* 101(18):7158-7163.
- Young HM, Ciampoli D (1998) Transient expression of neuronal nitric oxide synthase by neurons of the submucous plexus of the mouse small intestine. *Cell Tissue Res* 291(3):395-401.
- Young HM, Furness JB, Sewell P, Burcher EF, Kandiah CJ (1993) Total numbers of neurons in myenteric ganglia of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 272:197-200.
- Yunker AM, Galligan JJ (1994) Extrinsic denervation increases NADPH-diaphorase staining in myenteric nerves of guinea pig ileum. *Neurosci Lett* 167:51-54.
- Zhang X, Fogel R (2003) Involvement of glutamate in gastrointestinal vago-vagal reflexes initiated by gastrointestinal distension in the rat. *Auton Neurosci* 103(1-3):19-37.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik lehetővé tették számomra, hogy a Ph.D. értekezésem létrejöhessen.

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Fekete Éva egyetemi tanárnak és Dr. Bagyánszki Mária egyetemi adjunktusnak a folyamatos segítséget, figyelmet és türelmet, amivel munkámat végigkísérték.

Köszönöm Dr. Resch Béla egyetemi tanárnak a segítségét, aki lehetővé tette a humán vizsgálati anyaghoz való hozzájutást.

Köszönöm Dr. Gulya Károly tanszékvezető egyetemi tanárnak és Dr. Toldi József tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tették számomra Ph.D. értekezésem elkészítését az Állattani és Sejtbiológiai Tanszéken, valamint az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszéken.

Köszönetemet fejezem ki Bódi Nikolett Ph.D. hallgatónak is, munkám során nyújtott segítségéért, értékes útmutatásaiért, észrevételeiért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a Családomnak mindazt a segítséget, amellyel támogatták a tanulmányaimat.

IX. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Teljes közlemények

1. **N. Linke**, N, Bódi, B.A. Resch, É. Fekete, M. Bagyánszki (2008)

Developmental pattern of three vesicular glutamate transporters in the myenteric plexus of the human fetal small intestine. Histology and Histopathology 23(8):979-86 **IF:2.182**

2. F. Izbéki, T. Wittman, A. Rosztóczy, **N. Linke**, N. Bódi, É. Fekete, M. Bagyánszki (2008)

Immediate insulin treatment prevents gut motility alterations and loss of nitrergic neurons in the ileum and colon of streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes Research and Clinical Practice 80(2):192-8 **IF:1.837**

3. M. Krecsmarik, F. Izbéki, M. Bagyánszki, **N. Linke**, N. Bódi, J. Kaszaki, Z. Katarova, Á. Szabó, É. Fekete, T. Wittman (2006)

Chronic ethanol exposure impairs neuronal nitric oxide synthase in the rat intestine. Alcoholism: Clinical and Experimental Research 30(6):967-73 **IF:2.933**

4. **N. Linke**, Z. Novák, M. Krecsmarik, É. Fekete, H. Orvos, A. Pál, M. Bagyánszki (2006)

Identification of c-kit-positive cells in the human umbilical vein. Placenta (submitted)

Nyomtatásban megjelent előadás kivonatok

1. N. Bódi, **N. Linke**, F. Izbéki, M. Bagyánszki, É. Fekete (2007)

Loss of nitrergic myenteric neurons in diabetic rats coincides with structural alterations in capillaries supplying the myenteric plexus. XVI. Nemzetközi Semmelweis Szimpózium és VI. Magyar Sejtanalitika Konferencia, Budapest, Hungary, 2007

2. **N. Linke**, N. Bódi, Á. B. Resch, É. Fekete, M. Bagyánszki (2007)

Prenatal development of glutamatergic neurons in the human enteric nervous system.

XVI. Nemzetközi Semmelweis Szimpózium és VI. Magyar Sejtanalitika Konferencia,
Budapest, Hungary, 2007

3. **N. Linke**, F. Izbéki, M. Bagyánszki, N. Bódi, A. Rosztóczy, É. Fekete, J. Lonovics, T. Wittmann (2007)

Early insulin treatment prevents the loss of nitrergic neurons in the ileum and colon and restores altered gut motility in streptozotocin-induced diabetic rats. 49th Annual Meeting of the Hungarian Society of Gastroenterology, Tihany, Hungary, 2007, Gastroenterologie 2007, 5: 434

4. N. Bódi, **N. Linke**, F. Izbéki, M. Bagyánszki, É. Fekete (2007)

Loss of nitrergic myenteric neurons in diabetic rats coincides with structural alterations in capillaries supplying the myenteric plexus. 14th International Student Congress of Medical Sciences, Groningen, The Netherlands, 2007

5. **N. Linke**, N. Bódi, B. Á. Resch, É. Fekete, M. Bagyánszki (2007)

Glutamaterg neuronok prenatális fejlődése a humán bélidegrendszerben. Wind Spring 2007, 10th International Meeting for Hungarian Scientists, PhD Students and Researchers, Budapest, Hungary, 2007

6. **N. Linke**, N. Bódi, B. Á. Resch, B. E. Resch, É. Fekete, M. Bagyánszki (2007)

Prenatal development of glutamatergic neurons in the human enteric nervous system. Magyar Idegtudományi Társaság XI. Konferenciája, Szeged, Hungary, 2007

7. **N. Linke**, Z. Novák, M. Krecsmarik, É. Fekete, H. Orvos, A. Pál, M Bagyánszki (2006)

Identification of C-kit positive cells in the human umbilical vein. European Academy of Paediatrics Congress, Barcelona, Spain, 2006

8. **N. Linke**, N. Bódi, V. Balázs, Zs. Feltóti, F. Izbéki, É. Fekete, M. Bagyánszki (2006)

Quantitative changes in the nitrenergic neurons in diabetic rat. Wind Spring 2006, 9th International Meeting for Hungarian Scientists, PhD Students and Researchers, Kaposvár, Hungary, 2006

9. **N. Linke**, N. Bódi, V. Balázs, Zs. Feltóti, F. Izbéki, É. Fekete, M. Bagyánszki (2006)

Quantitative changes in the nitrenergic neurons in diabetic rat. International IBRO Workshop, Budapest, Hungary, 2006, Clinical Neuroscience 2006, 59(S1):42